

**Infrarotspektroskopische Untersuchungen von
Konformationsumwandlungen und Carboxylgruppen
in biologischen Membranen**

Sakiko Hornik

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549006_0041

Infrarotspektroskopische Untersuchungen von
Konformationsumwandlungen und Carboxylgruppen
in biologischen Membranen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des
Fachbereiches Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Sakiko Hornik
München 1978

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Zundel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 19. 12. 1978



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom September 1974 bis September 1978 im Institut für physikalische Chemie der Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Georg Zundel,

der das Thema dieser Arbeit anregte, möchte ich besonders herzlich für die wertvollen Diskussionen und sein großzügiges Entgegenkommen bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. E. Mehl vom Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München danke ich für die Isolierung des Myelins.

Herrn A. Röhrich danke ich für die rasche Beschaffung der Chemikalien und den Herren F. Reim und E. Rupp für die Durchführung feinmechanischer Arbeiten.

Mein Dank gilt besonders

Herrn Biesler, Küchenchef des Hotels Vier Jahreszeiten
Herrn Maier, Inhaber des Fischgeschäftes Maier
Herrn Kneidl, Fischzüchter, Waginger See

für ihre freundliche Hilfe bei der Beschaffung von Hechten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für finanzielle Förderung.

Inhalt

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Experimenteller Teil</u>	3
2.1. Meß-Technik	3
2.1.1. FMIR-Technik	3
2.1.2. Herstellung der Küvette	6
2.2. Isolierung der biologischen Membran	8
2.2.1. Axonmembran	8
2.2.1.1. Bestimmung der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase Aktivität	11
2.2.1.2. Bestimmung des Protein- Gehaltes	13
2.2.2. Isolierung des Myelins	13
2.3. Vorbereitung für die Spektren-Aufnahme	14
2.3.1. Herstellung des Ionen- milieus	14
2.3.1.1. Zusammenstellung des Ionen- milieus	14
2.3.1.2. $\text{H}_2\text{O} - \text{D}_2\text{O}$ Austausch	15
2.3.2. Herstellung der Proben mit entsprechenden Ionen	15
2.3.2.1. Dialyseverfahren	16
2.3.3. Durchführung einer Meß-Reihe	16
2.3.4. Spektrenaufnahme	17
2.3.4.1. Kompensation	17
2.3.4.2. Aufnahme der Spektren	18
2.4. Ermittlung der Titrationskurve	18

3.	<u>Derzeitige Erkenntnisse über</u> <u>erregbare Membranen</u>	19
3.1.	Membranpotential	19
3.2.	Aktionspotential	23
3.3.	Aktiver Transport	28
3.4.	Ionenkanal	33
3.4.1.	Na ⁺ -Kanal	33
3.4.2.	K ⁺ -Kanal	41
3.5.	Oberflächenladung	43
3.6.	Konformationsänderung der erregbaren Membran	49
4.	<u>Eigene Messungen, Ergebnisse</u> <u>und Diskussion</u>	55
4.1.	Konformationsuntersuchungen	55
4.1.1.	Kationenabhängigkeit	58
4.1.2.	pH-Abhängigkeit	62
4.1.3.	Vergleich der Konformation der Axonmembranvesikeln in Phosphat-Puffer	64
4.1.4.	Konformation bei natürlichem Ionenmilieu	65
4.1.5.	ATP-Zugabe	66
4.1.6.	Pellet-Fraktion	68
4.2.	-COO ⁻ Gruppe	70
4.2.1.	Vergleich von Axon- und Myelinvesikeln	75
4.2.2.	pKa der -COO ⁻ Gruppe in der Axonmembran	76
4.2.3.	Flächendichte der -Coo ⁻ Gruppe in der Axonmembran	78
4.2.3.1.	-COO ⁻ Gruppen und Ionenkanal	80
5.	<u>Zusammenfassung</u> <u>Literatur</u>	81

1. Einleitung

Seit mehreren Jahren gehören die Eigenschaften, Strukturen und Funktionen biologischer Membranen zu den wichtigsten Themen der Forschung im naturwissenschaftlichen Bereich. Um genaue Informationen über diese Membranen zu gewinnen, ist es erforderlich, daß entsprechende Untersuchungen unter möglichst naturnahen Bedingungen durchgeführt werden. Berücksichtigt man diesen Gesichtspunkt, dann ist die IR-Spektroskopie dafür sehr geeignet.

Danielli und Davson (1) stellten 1935 nach funktionellen und physiologischen Untersuchungen an Plasmamembranen erstmals ein Modell der Membranstruktur auf. Inzwischen konnte durch die Anwendung von Elektronenmikroskopen mit hohem Auflösungsvermögen in manchen Fällen nachgewiesen werden, daß die Membranen flächenhafte, aggregierte Einheiten aus Protein (2), Phospholipid (3) oder Lipoprotein (2, 4) sind. Dabei orientieren sich die polaren Gruppen dieser Moleküle zum extra-beziehungsweise intrazellulären Medium, während sich die unpolaren Gruppen zum Innern der Membran orientieren. Damit befinden sich die geladenen, polaren Gruppen an der Membranoberfläche. In den letzten Jahren wurde, wie in den nächsten Kapiteln beschrieben wird, nachgewiesen, daß diese Oberflächenladung bei der Funktion der biologischen Membranen, die mit physikochemischen Prozessen eng verbunden ist, eine große Rolle spielt. Ferner wurde inzwischen nahegelegt, daß der Erregungsvorgang mit einer Konformationsänderung der Membranproteine in Zusammenhang steht (19).

In der vorliegenden Arbeit versuche ich mit Hilfe der IR-Spektroskopie, speziell FMIR-Technik, weitere Informationen über die Carboxylgruppen, welche bei der Oberflächenladung eine große Rolle spielen, zu gewinnen. Ferner wurde die Konformationsänderung der Membranproteine unter verschiedenen, jedoch möglichst naturnahen Bedingungen, näher untersucht. Dabei vergleiche ich die erhaltenen Ergebnisse der Untersuchungen an Axonmembranen mit denen am Myelin, um den Unterschied zwischen erregbaren und nichterregbaren Membranen aufzuzeigen.

2. Experimenteller Teil

2.1. Meß-Technik

2.1.1. FMIR-Technik

Bei der sog. FMIR-Technik (Frustrated Multiple Internal Reflectance) (5) wird der Teil des Strahls ausgenutzt, der bei Totalreflexion an einer Grenze zwischen optisch dichterem und weniger dichtem Material noch in das optisch weniger dichte Material eindringt.

Im Einzelnen verfährt man folgendermaßen:

- 1) Man verwendet als optisch dichteres Medium ein Material, dessen Brechungsindex größer ist als derjenige der Probe und der in einem größeren Wellenlängenbereich konstant bleibt (6). Es eignet sich dafür ein Germanium-Kristall ($n=4.1$). Abb. 1 zeigt den Ge-Kristall der Fa. Harrick Sci. Corp. Box 867 Ossining N.Y. 10562 für 25 Reflexionen, den ich für meine Untersuchungen verwendete.

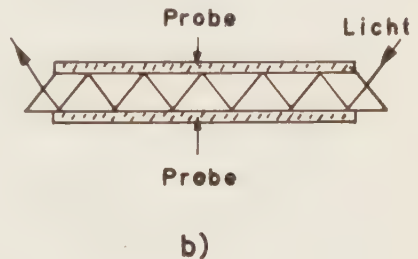
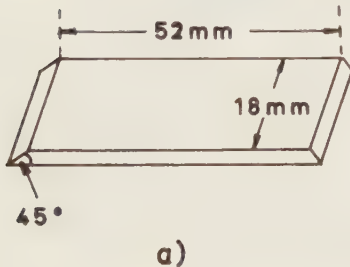


Abb. 1 : Ge-Kristall für FMIR-Technik

- 2) Man trägt das Probenmaterial möglichst gleichmäßig und dicht auf die Ge-Platte auf und läßt den IR-Strahl senkrecht zu einer schräg geschnittenen Seite so einfallen, daß er mehrmals in der Ge-Platte reflektiert wird (siehe Abb. 1b).
- 3) Dabei dringt der Strahl in die aufgetragene Substanz ein. Die Eindringtiefe liegt in der Größenordnung einer Wellenlänge des Lichtes und hängt von Einfallswinkel und vom Verhältnis der Brechungsindizes ab. Das in die Probe einge-drungene Licht wird dort mehr oder weniger absorbiert. Der Rest wird weiter durch den Kristall geleitet und tritt an der gegenüberliegenden Fläche aus.

Dieses Prinzip der FMIR-Technik bringt folgende Vorteile:

- 1) Man kann als Untersuchungsmaterial nicht nur durchsichtige Lösungen, sondern auch Suspensionen, wie z.B. Membranfraktionen, verwenden. Außerdem kann das biologische Material im natürlichen Zustand wesentlich leichter als mit der Flüssigkeitsküvette untersucht werden.
- 2) Wie wir später sehen werden, kann die Reversibilität der in der Membranfraktion auftretenden Effekte leicht nachgeprüft werden, da man direkt in der Küvette das Material dialysieren kann.
- 3) Im Zusammenhang mit 2) braucht man somit keine großen Substanzmengen, wenn man die Meßreihen, wie z.B. die pH-Abhängigkeit, durchführen will.
- 4) Die Intensität einer Bande hängt nicht nur von der Konzentration des Materials ab, sondern auch von der Größe der Fläche, auf der die Substanz die Ge-Platte direkt berührt. Damit läßt sich die Absorption der Banden durch die Größe der mit Substanz belegten Ge-Oberfläche variieren,

was bei sehr stark absorbierenden Substanzen ein wesentlicher Vorteil ist.

Abb. 2a zeigt das notwendige Zubehör, das für Substanz- und Vergleichsküvette verwendet wird. Es enthält insgesamt vier Spiegel, die bezüglich aller Winkel justiert werden können. Außerdem ist ein Küvettenhalter vorhanden, dessen Lage ebenfalls verstellbar ist. Stellt man diese vier Spiegel und den Küvettenhalter optimal ein, so enthält man den in Abb. 2b gezeichneten Strahlengang.

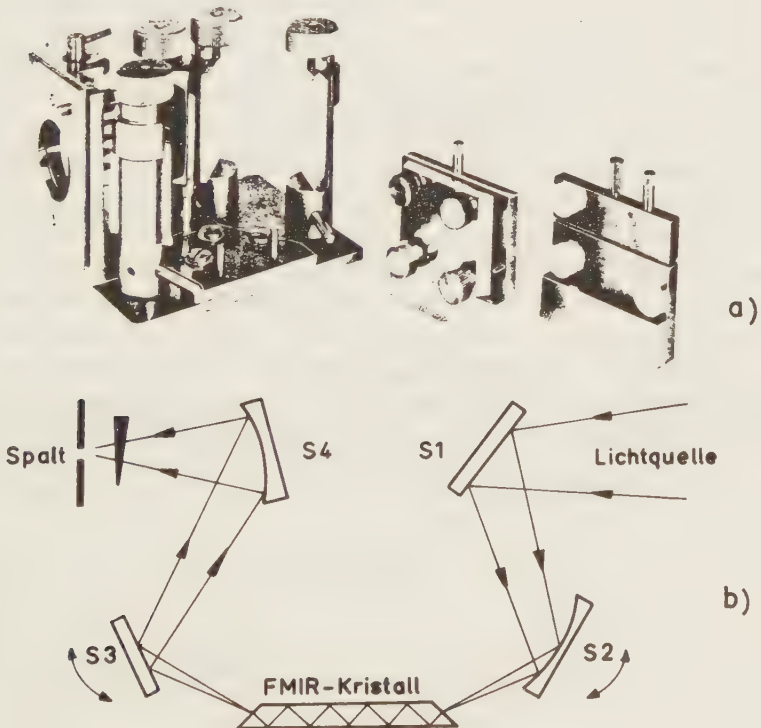


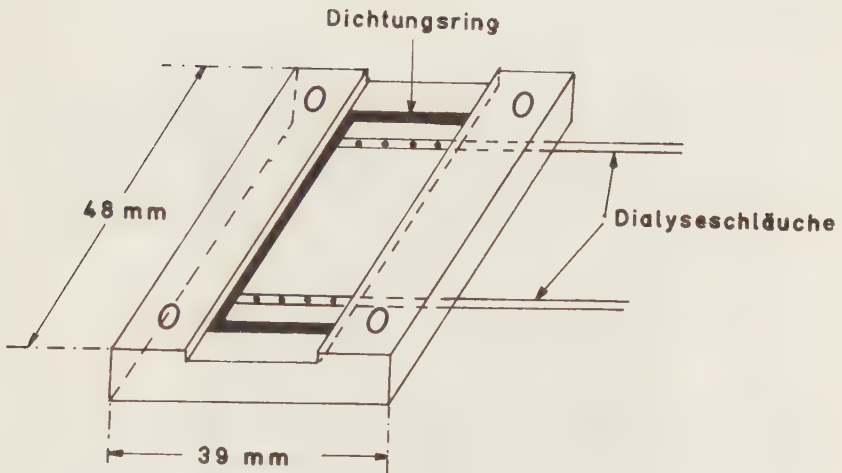
Abb. 2 : a) Zubehör für FMIR-Technik
b) Optisches Schema

Da es insgesamt neun Möglichkeiten der Justierung gibt, entsteht der folgende Nachteil: Durch eine kleine Änderung an einem einzelnen Spiegel wird die gesamte Justierung sehr stark beeinflusst, und daher können im Spektrum sehr leicht Artefakte auftreten.

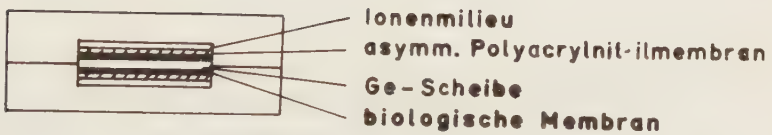
2.1.2. Herstellung der Küvette

Die Küvette für die Untersuchung wurde aus Acrylglas hergestellt. Abb. 3a und b zeigt diese.

Die Küvette wird mit der Dialyseflüssigkeit über Siliconschläuche mit einem Durchmesser von 2.5mm gespült. Diese Schläuche werden in die entsprechenden Kanäle der Küvette eingeklebt. Diese Kanäle haben über mehrere Löcher mit dem Innenraum der Küvette Kontakt, damit verteilt sich die Dialyselösung in der Küvette sehr gut. Die Substanz ist von dem gespülten Raum durch eine asymmetrische Membran aus Polyacrylnitril getrennt. Diese hat keine IR-Banden in dem für mich interessanten Spektralbereich zwischen 1800cm^{-1} und 1000cm^{-1} . Am Rand des Innenraums befindet sich eine umlaufende Nut mit 1.5mm Breite und 0.7mm Tiefe, in der ein 1.4mm dicker Dichtungsring aus Viton liegt. Die beiden Küvettenteile werden durch vier Schrauben von außen her zusammengehalten. Mit weiteren vier Schrauben wird die Küvette am Küvettenhalter befestigt.



a)



b)

Abb. 3 : FMIR-Küvette

2.2. Isolierung der biologischen Membranen

2.2.1. Axonmembran

Als Axonmembran verwendete ich die des Olfactorius des Hechtes. Diese Nervenfasern haben folgende Eigenschaften (7):

- 1) Die Nervenfasern bestehen aus $4,2 \times 10^6$ nicht-myelinisierten Einzelfasern: 95% davon haben einen durchschnittlichen Durchmesser von $0,19 \mu\text{m}$ und für die restlichen 5% beträgt der Wert $0,6 \mu\text{m}$.
- 2) Die Dicke der Axonmembran der Einzelfaser beträgt $80 \times 10^{-4} \mu\text{m}$

Abb. 4 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts des Olfactorius. Für eine Untersuchung brauchte ich acht Olfactorii aus vier lebenden, mindestens sechs Pfund schweren Hechten. Die Herstellung der Axonmembran aus diesen verläuft wie folgt:

- 1) Die Köpfe der vier Hechte wurden abgeschnitten und sofort auf Eis gelegt.
- 2) Aus den Köpfen wurden die Olfactorii herausgeschnitten und das überflüssige Gewebe entfernt.
- 3) Die acht Olfactorii + 1ml H_2O wurden in einem Glas-Potter (Firma B. Braun Melsungen AG) mit einem Teflon-Stab bei 0°C mit 1000 UPM 5 mal 1 min. homogenisiert. Zwischen den einzelnen Homogenisierungen ließ ich die Suspension 1 Min. lang bei 0°C stehen; zwischen der zweiten und dritten Homogenisierung jedoch 5 Minuten.

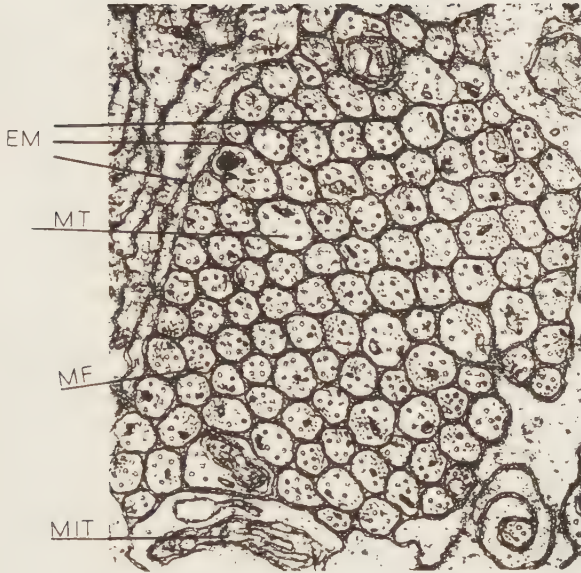


Abb. 4 : EM-Aufnahme des Olfactorius des Hechtes;

EM = erregbare Membran

MT = Mikrotubuli

MF = Mikrofilamente

MIT = Mitochondrion

- 4) Die Suspension wurde dann in Mikrotuben 3810 (Firma Eppendorf) mit dem Rotor Typ Ti 50 der Firma Beckman 120 min. bei 4° C mit der maximalen Drehzahl von 48×10^3 UPM abzentrifugiert. Ich gewann daraus eine in drei Schichten getrennte Suspension (Abb. 5). Die untere Schicht bezeichnete ich als Pellet-Fraktion. Die Membranfraktionen befinden sich dann in der mittleren Schicht.

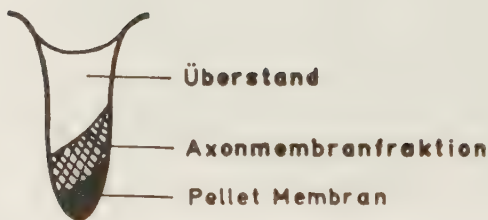


Abb. 5 : Drei Fraktionen der Olfactorii nach der Abzentrifugation

- 5) Die Axonmembranfraktion wurde dann von den restlichen zwei Schichten mechanisch abgetrennt und mit H_2O auf 1ml aufgefüllt.
- 6) Unter gleichen Bedingungen wurde sie dann nochmals abzentrifugiert.

7) 5) und 6) wurden dann noch einmal wiederholt. Die so gewonnene Axonmembranfraktion benutzte ich als Probe.

2.2.1.1. Bestimmung der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase Aktivität

Es ist bekannt, daß die sog. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase nur an der Plasmamembran vorhanden ist (8). Daher gibt die Aktivität dieser ATPase Auskunft darüber, ob die nach den obigen Verfahren gewonnene Axonmembranfraktion die gewünschte Fraktion ist. Um dieses zu prüfen, führte ich an der Axonmembranfraktion am Überstand und an der Pellet Fraktion einen ATPase Assay folgendermaßen durch:

Die Axonmembranfraktion, Pellet Fraktion und der Überstand wurden mit 3mM Tris-HCl Puffer jeweils auf 3ml (im Fall der Pellet Fraktion jedoch auf 5ml) aufgefüllt. Die Phosphatbestimmung wurde nach Fiske et al. (9) in folgenden Ionenmilieus durchgeführt:

1) für die Aktivität der gesamten ATPase

125mM	Tris / HCl	Puffer	pH 7,5
100mM	NaCl		
20mM	KCl		
5mM	MgCl_2		

2) für die Aktivität der Mg^{2+} -ATPase

125mM	Tris / HCl	Puffer	pH 7,5
5mM	MgCl_2		

3) Um die Aktivität der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase zu hemmen, wurde zusätzlich 1mM Ouabain zu der Lösung 1) zugegeben.

4) Um die Aktivität der Mitochondrien ATPase zu hemmen, wurde 5mM NaN_3 zu der Lösung 2) zugegeben.

1,3ml von der jeweiligen Lösung + 0,3ml H₂O + 0,1ml von der jeweiligen Probe wurden 5 min. bei 37° C inkubiert. Danach wurde 0,2ml Tris₂ATP dazugegeben und 15 min. bei 37° C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 0,1ml 3% HClO₄ rasch gestoppt und das freigesetzte Phosphat photometrisch bestimmt. Die Ergebnisse lauteten:

	Axonmembran- fraktion	Pellet Fraktion	Überstand
Mg ²⁺ -ATPase	14,82 mMP/mg/Std	4,0 mMP/mg/Std	1,25 mMP/mg/Std
gesamte ATPase	32,00	3,52	1,25
mit Ouabain	21,33	3,52	1,25
mit NaN ₃	10,66	1,2	1,25
Na ⁺ -K ⁺ ATPase	10,67	0	0
% Anteil an Mitochondrien ATPase	28 %	70 %	0

Aus diesen Resultaten sieht man einmal, daß die Aktivität der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase nur an der Axonmembranfraktion vorhanden ist und zum anderen, daß die Mitochondrien ATPase nur 28% an der Axonmembranfraktion beteiligt ist. Dagegen befinden sich 70% in der Pellet Fraktion. Hiermit wurde bewiesen, daß die Axonmembranfraktion also tatsächlich die gewünschte Fraktion ist.

2.2.1.2. Bestimmung des Protein-Gehaltes

Die drei Fraktionen des Olfactorius, Axonmembranfraktion, Überstand und Pellet Fraktion, wurden mit 3ml 3mM Tris-HCl Puffer auf 3ml aufgefüllt. Der Protein-Gehalt der jeweiligen Fraktionen wurde dann nach Lowry (10) bestimmt. Die Ergebnisse sind:

	Axonmembranfraktion	Pellet Fraktion	Überstand
Protein mg/100mg Feuchtgewicht des Olfactorius	1,01	0,95	1.13

2.2.2. Isolierung des Myelins

Myelin wurde mit Hilfe von Dr. E. Mehl vom Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München aus dem Cerebralcortex des Schweins nach Cotman et al. (11) isoliert.

2.3. Vorbereitung für die Spektren-Aufnahme

2.3.1. Herstellung des Ionenmilieus

2.3.1.1. Zusammenstellung des Ionenmilieus

Folgende Ionenmilieus verwendete ich für meine Untersuchungen:

1) Kakodylat Puffer

Na -Kakodylat Puffer:

100mM NaCl + 5mM Na -Kakodylat pH 7,4

K -Kakodylat Puffer:

100mM KCl + 5mM K -Kakodylat pH 7,4

2) Tris-EDTA Puffer

1mM EDTA + 1mM Tris pH 7,4

3) EDC-haltige Lösung

Da die Reaktion zwischen EDC und den Carboxyl-Gruppen bei pH Werten $< 5,0$ und relativ hoher Konzentration (12) stattfindet, stellte ich die folgende Lösung her:
0,1 M EDC in 125ml Na -Kakodylat Puffer mit pH 7,4.
Diese wurde dann mit HCl auf pH 5,0 eingestellt.

4) Physiologische Lösungen

125mM NaCl + 3,5mM KCl + 3,5mM CaCl_2 + 1mM Natrium-phosphat Puffer pH 7,0.

Für die Untersuchungen in Kapitel 4.1.3. ersetzte ich

- 1) 3,5mM CaCl_2 durch 3,5mM KCl

2) 125mM NaCl durch 125mM KCl und 3,5mM CaCl_2 durch 3,5mM KCl.

(Dabei wurde 1mM Na-Phosphat Puffer durch 1mM K-Phosphat Puffer pH 7,0 ersetzt.)

3) 3,5mM KCl und 3,5mM CaCl_2 jeweils durch 3,5mM NaCl.

Bei den Untersuchungen mit abnehmendem pH versetzte ich die entsprechenden Lösungen mit HCl und bekam so den gewünschten pH-Wert.

2.3.1.2. H_2O - D_2O Austausch

Zur Herstellung des Kakodylat-Puffers in D_2O tauschte ich die H^+ -Ionen des Kakodylat-Puffers in H_2O gegen D^+ -Ionen aus. Dazu wurde der Kakodylat-Puffer mit pH 7,4 in H_2O zuerst gefriergetrocknet und danach in D_2O aufgelöst. Diesen Vorgang wiederholte ich dreimal. Anschließend löste ich das Salz in der entsprechenden Menge D_2O auf, so daß die Konzentration des jeweiligen Salzes in D_2O mit der in H_2O übereinstimmte. Für die Untersuchungen mit unterschiedlichen pD-Werten variierte ich diesen mit DCl.

2.3.2. Herstellung der Proben mit entsprechenden Ionen

Nach der Abzentrifugation trug ich die Axonmembranfraktion bzw das Myelin möglichst dünn und gleichmäßig auf beide Seiten der Ge-Platte auf und legte darauf für die Dialyse eine selbsthergestellte asymmetrische Polyacrylnitrilmembran. Danach dialysierte ich die Probe direkt in der Küvette gegen entsprechende Ionenmilieus.

Die asymmetrische Membran aus Polyacrylnitril stellte ich nach einer Vorschrift von Dr. Strathmann (Forschungsinstitut Berghof) folgendermaßen selbst her: 15g Polyacrylnitril (BASF 190 Polyacrylnitril) wurden unter starkem Rühren im Wasserbad (100° C) in 85g Dimethylformamid (DMF) gelöst. Danach wurde diese Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt, auf einer Glasplatte gespreitet und rasch ins Wasser gelegt. Damit gewann ich die gewünschte asymmetrische Membran aus Polyacrylnitril.

2.3.2.1. Dialyseverfahren

Um die Probe mit dem entsprechenden Ionenmilieu herzustellen, ließ ich 30ml der Lösung dieses Ionenmilieus mit Hilfe einer elektrischen Pumpe 3 Stunden bei 17° C durch die Küvette laufen (siehe Abb. 3).

2.3.3. Durchführung einer Meß-Reihe

Die Meß-Reihen führte ich folgendermaßen durch:

- 1) Im Fall der kationenabhängigen Konformationsänderungen:
 - a) Dialyse gegen Na-Kakodylat Puffer pH 7,4
 - b) Aufnahme des Spektrums
 - c) Dialyse gegen K-Kakodylat Puffer pH 7,4
 - d) Aufnahme des Spektrums
 - e) Dialyse gegen Tris-EDTA Puffer pH 7,4 (in diesem Fall verwendete ich 50ml statt 30ml)
 - f) mit der so behandelten Probe wurden die Schritte von a) bis d) noch einmal wiederholt.
- 2) Bei den Untersuchungen mit abnehmendem pH begann ich mit pH 7,4. Nach jeder Dialyse nahm ich die Spektren auf und kam bis pH 1,6. Um die Reversibilität zu prüfen, dialysierte ich anschließend wieder gegen das entsprechende Ionenmilieu mit pH 7,4 zurück. Dieser Vorgang wurde für jede pH-Serie sowohl mit Na- als auch mit K-Kakodylat Puffer durchgeführt.

- 3) Für die Untersuchung der Reaktion der Carboxyl-Gruppen mit EDC dialysierte ich die Membranfraktion zunächst gegen Na-kakodylhaltige Lösung mit pH 5,0. Diese dialysierte ich dann gegen 40ml EDC-haltige Lösung. Um die Reversibilität der auftretenden Effekte zu prüfen, führte ich die Rückdialyse wieder gegen Na⁺-Kakodylat-Lösung (pH 5,0) durch.

2.3.4. Spektrenaufnahme

2.3.4.1. Kompensation

Da ich bei meinen Untersuchungen Ionenmilieus mit H₂O bzw D₂O verwendete, traten folgende Banden im Bereich von 4000 cm⁻¹ - 1000 cm⁻¹ auf.

Gruppierung	Schwingung	Wellenzahl [cm ⁻¹]
H-O-H	Valenzschwingung	3420
D-O-D	"	2540
H-O-H	Scherenschwingung	1645
D-O-D	"	1215

Die Bande der H₂O Scherenschwingung überlagert sich genau mit der Amid I-Bande und die D₂O Scherenschwingung verdeckt die Banden der >PO₂-Gruppen. Um diese Banden der Scherenschwingungen zu kompensieren, ist es nötig, in der Vergleichsküvette eine gleich stark absorbierende Schicht der reinen Pufferlösung zu haben. Dazu klebte ich einen dünnen Gummiring auf den Rand des Innenraums der Vergleichsküvette und deckte ihn mit Platinfolie ab, da er ebenfalls Banden

hervorrufen, die im Bereich von 1800cm^{-1} bis 1000cm^{-1} auftreten. Danach füllte ich die Vergleichsküvette mit Na-Kakodylat Puffer pH 7,4 in H_2O bzw. in D_2O . Um die Kompensation von H_2O bzw. von D_2O zu prüfen, nahm ich die Spektren im Bereich von 4000cm^{-1} bis 2000cm^{-1} auf. Betrachtet man die Intensität der H_2O bzw. D_2O Valenzschwingung, so sieht man, daß diese schwächer geworden ist. Durch mehrmalige Änderung der Breite des Gummirings erreichte ich eine H_2O bzw. D_2O Kompensation bis zu 90%.

2.3.4.2. Aufnahme der Spektren

Die Spektren der Membranfraktion wurden mit einem Infrarot-Gitter-Spektrophotometer der Firma Perkin-Elmer, Modell 325, mittels FMIR-Technik im Bereich von 1800cm^{-1} bis 1000cm^{-1} aufgenommen. Gerät-Einstellung: Spaltprogramm 8, Zeitkonstante 3, Verstärkung 2,5. Die Empfindlichkeit des Gerätes wurde bei den Messungen laufend überprüft. Wegen der geringen Intensitäten der Banden mußte ich die Spektren mit 1,7-facher Ordinaten-Dehnung aufnehmen. Die Registriergeschwindigkeit betrug 10 Wellenzahlen pro Minute. Während der Messungen thermostatisierte ich die Axonmembranfraktion auf 17°C und das Myelin auf 22°C . Der Meßraum wurde mit einem Spülgerät von gasförmigem H_2O sowie von CO_2 freigehalten.

2.4. Ermittlung der Titrationskurve

Um die Titrationskurve für die pK_a -Bestimmung zu erhalten, bestimmte ich die Fläche der $\nu_\text{s}\text{-COO}^-$ Bande in Abhängigkeit von dem pH-Wert. Diese Fläche ist dann zur Anzahl der -COO^- -Gruppen proportional. Die absolute Konzentration ermittelte ich durch Vergleich mit Spektren wässriger Natrium-Carbonatlösungen.

3. Derzeitige Erkenntnisse über erregbare Membranen

3.1. Membranpotential

Alles lebendige Geschehen ist eng mit bioelektrischen Eigenschaften verbunden. Dies bedeutet, daß zwischen dem Inneren einer Zelle und dem sie umgebenden extrazellulären Medium eine Potentialdifferenz besteht, das sog. Membranpotential. Über seine Änderung wird z.B. die Funktion der Nervenzelle gesteuert. Dieses Membranpotential ist bei den meisten biologischen Zellen über längere Zeiten konstant, wenn keine äußeren Einflüsse auf die Zelle einwirken. Daher nennt man dieses Membranpotential der Zelle "Ruhepotential". Dieses Membranpotential kann mit Hilfe einer Ultramikroelektrode direkt an der Zellmembran gemessen werden. Zum Beispiel ist an der Zellmembran einer Nervenfaser, wenn sie sich in ruhendem Zustand befindet, das Potential im Zellinnern ca. 80mV negativer als im Außenmedium. Die Entstehung und Aufrechterhaltung dieses Membranpotentials beruht darauf, daß durch einen aktiven Ionentransport im extrazellulären Medium eine hohe Na^+ - und Cl^- -Ionenkonzentration aufrechterhalten wird. Allgemein ist bei Nerven- und Muskelzellen die intrazelluläre K^+ -Konzentration 20-100 mal höher als die extrazelluläre. Die intrazelluläre Na^+ -Konzentration ist 5-15 mal, die intrazelluläre Cl^- -Konzentration 20-100 mal niedriger als die extrazelluläre (Tab. 1). Außerdem enthält das intrazelluläre Medium große, kolloidale, negativ geladene Partikel, die Polyanionen, für die die Membran nicht permeabel ist. Sie sind für die Elektroneutralität im Innern der Zelle mitverantwortlich.

Substanz	Konzentration (mM/gk H ₂ O)	
	Axoplasma	Blut
K	400	20
Na	50	440
Cl	40-150	560
Ca	0,4	10
Mg	10	54
Isethionat	250	-
Aspartat	75	-
Glutamat	12	-
Succinat + Fumarat	17	-
Orthophosphat	2,5-9	-
A T P	0,1-1,7	-
Argininphosphat	1,8-5,7	-
H ₂ O	865g/kg	870g/kg

Tabelle 1 : Konzentration der Ionen und anderer Substanzen
im Axon des Tintenfisches (13).

Wenn die Membran nur für K^+ -Ionen permeabel wäre, würden nur K^+ -Ionen gemäß ihrem Konzentrationsgefälle aus der Zelle herausdiffundieren. Dadurch würde sich ein elektrisches Feld aufbauen, das den ausströmenden K^+ -Ionen entgegenwirkt. Dadurch entsteht ein Gleichgewicht für Ein- und Ausströmen der Ionen und der Nettofluß wird Null. Dieses K^+ -Ionengleichgewichtspotential wird durch die Nernstsche Gleichung beschrieben:

$$E_k = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_a}{[K^+]_i}$$

$[K^+]_a$: K^+ -Ionenkonzentration im extrazellulären Medium
 $[K^+]_i$: " " intrazellulären Medium
R : Gaskonstante
T : absolute Temperatur
F : Farady-Konstante

Nach der Theorie von Bernstein (14) sollte das K^+ -Ionen-Diffusionspotential bereits qualitativ das Ruhepotential an der Membran wiedergeben. Dies ist jedoch nicht der Fall. Das K^+ -Gleichgewichtspotential stimmt zwar in erster Näherung recht gut mit dem gemessenen Ruhepotential überein. Betrachtet man es jedoch in Abhängigkeit von der extrazellulären K^+ -Konzentration, so stellt man bei kleinen extrazellulären K^+ -Konzentrationen eine beträchtliche Abweichung von dem erwarteten Verhalten fest (15) (Abb. 6). Bei so kleiner K^+ -Konzentration im Außenmedium, wie sie bei biologischen Membranen im natürlichen Zustand vorliegen, ist das gemessene Ruhepotential weniger negativ als das durch die Nernstsche Gleichung berechnete. Werden die Na^+ -Ionen im extrazellulären Medium durch andere, größere Kationen (z.B. Cholin) ersetzt, für die die Membran nicht permeabel ist, so stimmt das gemessene Ruhepotential und das berechnete E_k auch bei niedrigen K^+ -Ionenkonzentrationen im Außenmedium wieder genau überein. Diese Befunde zeigen, daß nicht allein die K^+ -Ionen,

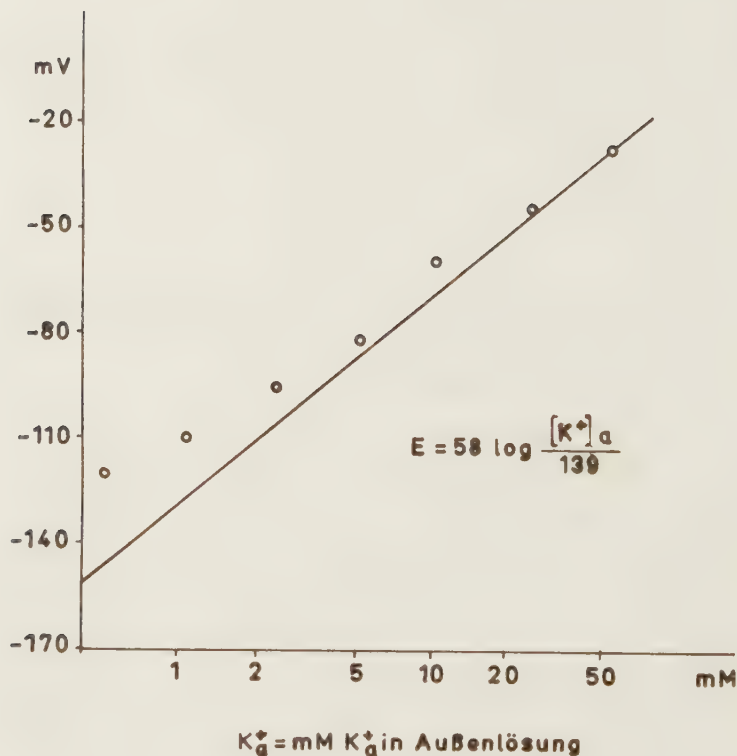


Abb. 6 : Abhängigkeit des Ruhepotentials von der extrazellulären K^+ -Konzentration. Die Kreise entsprechen den bei verschiedenen $[K^+]_a$ gemessenen Membranpotentialen. Die Gerade entspricht den durch die Nernst-Gleichung bei den verschiedenen $[K^+]_a$ gegebenen K^+ -Gleichgewichtspotentialen.

sondern auch die Na^+ - und natürlich auch Cl^- -Ionen das Ruhepotential beeinflussen. Die Membran ist also im Ruhezustand auch für diese Ionen permeabel, und die Konzentrationen von Na^+ - und Cl^- -Ionen sind bei der Berechnung des Membranpotentials zu berücksichtigen. Hodgkin und Katz (16) stellten daher das Membranpotential durch folgende Gleichung dar:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K \cdot [\text{K}^+]_a + P_{\text{Na}} \cdot [\text{Na}^+]_a + P_{\text{Cl}} \cdot [\text{Cl}^-]_a}{P_K \cdot [\text{K}^+]_i + P_{\text{Na}} \cdot [\text{Na}^+]_i + P_{\text{Cl}} \cdot [\text{Cl}^-]_i}$$

$P_K, P_{\text{Na}}, P_{\text{Cl}}$: Ionenpermeabilität von jeweils K^+ , Na^+ und Cl^-

Die Permeabilitäten der Membran für die einzelnen Ionen können experimentell bestimmt werden (17). Bezieht man die Werte P auf die Permeabilität für K^+ -Ionen, so ergibt sich für den Ruhezustand der Axonmembran

$$P_K : P_{\text{Na}} : P_{\text{Cl}} = 1 : 0,044 : 0,45$$

3.2. Aktionspotential

Die Aktivität der Nerven ist mit elektrischen Potential- und Permeabilitätsänderungen der Membran verbunden. Das elektrische Signal, das sog. Aktionspotential, ist selbst die sich ausbreitende Nachricht. Die Nachrichtenübertragung geschieht durch eine Änderung des Membranpotentials, die der erregbaren Membran entlangwandert. Ausgelöst wird das Aktionspotential durch eine Abnahme der Potentialdifferenz an der

Membran gegenüber dem Ruhezustand. Diese Abnahme der Potentialdifferenz wird als Depolarisation bezeichnet.

Depolarisiert man die Membran der Nervenfasern durch einen thermischen (18) oder elektrischen (19) Reiz, so wird, falls die Depolarisation ein gewisses Niveau, den Schwellenwert oder Threshold, erreicht, die Na^+ -Permeabilität der Membran bzw. die Na^+ -Leitfähigkeit der Membran drastisch erhöht. Dadurch dringen die Na^+ -Ionen rasch aus dem extrazellulären Medium durch die Membran in das Axoplasma ein. Durch diesen Na^+ -Einstrom wird die Membran weiter depolarisiert und dies verursacht eine erneute Zunahme der Na^+ -Permeabilität (20). Schließlich steigt das Membranpotential auf positive Werte und erreicht nahezu den Wert des Na^+ -Gleichgewichtspotentials:

$$E_{\text{Na}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[\text{Na}^+]_a}{[\text{Na}^+]_i}$$

Daß dieser Wert jedoch nicht ganz erreicht wird, liegt an folgendem: Die Na^+ -Permeabilität erhöht sich bei Erregung auf das 200-fache ihres Ruhewertes und wird damit siebenmal so groß wie die K^+ -Permeabilität. Letztere steigt dann jedoch ebenfalls mit einer Verzögerung von ca. 1 ms stark an (Abb. 7: Hier wurden jedoch Ionenleitfähigkeiten angegeben). Daher strömen die K^+ -Ionen aus dem Axoplasma und kompensieren den Na^+ -Einstrom der Na^+ -Ionen. Die erhöhte K^+ -Permeabilität sorgt für die Wiederherstellung des Ruhepotentials und der ursprünglichen Ionenpermeabilitäten der Membran. Diese Vorgänge bewirken den Verlauf des Aktionspotentials.

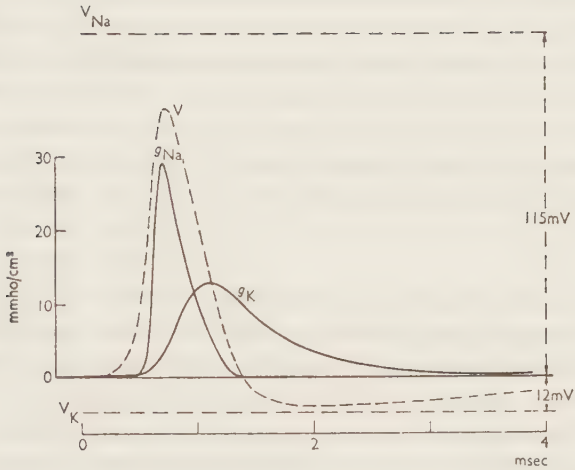


Abb. 7 : Theoretische Rekonstruktion eines fortgeleiteten Aktionspotentials (Kurve V) sowie der Na^+ - und K^+ -Leitfähigkeiten unter Verwendung experimenteller Daten ($18,5^\circ \text{C}$). Insgesamt errechneter Na^+ -Einstrom = $4,33 \times 10^{-12} \text{ M/cm}^2$, Gesamtverlust an K^+ -Ionen = $4,26 \times 10^{-2} \text{ M/cm}^2$ (21).

Wird die Membran durch den Reiz nicht mindestens bis zum Schwellenwert depolarisiert, findet kein weiterer Depolarisationsprozess statt. Das Potential fällt wieder auf den Ruhewert, eine Reizleitung erfolgt nicht. Dieses Phänomen ist als das "Alles oder Nichts-Gesetz" bekannt.

Die Fortleitung des Aktionspotentials wird dadurch bewirkt, daß das an einer Stelle der Membran aufgetretene Aktionspotential durch sein elektrisches Feld die Nachbarschaft über den Schwellenwert hinaus depolarisiert und dort ein Aktionspotential entsteht.

Da die Entstehung des Aktionspotentials ein rein passiver Vorgang ist, ist keine Energiezufuhr dafür notwendig. Die Potentialänderung entsteht als Folge passiver Diffusion von Na^+ -Ionen entlang ihres Konzentrationsgefälles. Das Aktionspotential kann daher wiederholt auftreten, solange die Na^+ -Konzentration im Zellinneren nur ausreichend niedrig bleibt (22). Energie wird dabei nur verbraucht, um dieses Konzentrationsgefälle aufrechtzuerhalten (siehe Kapitel 3.3.).

Na^+ -Ionen im extrazellulären Medium sind jedoch für die Entstehung des Aktionspotentials nicht essentiell. Auch bei Anwesenheit völlig anderer Ionen kann, wie im folgenden diskutiert wird, das Aktionspotential entstehen. Dies zeigt, daß der Entstehungsmechanismus des Aktionspotentials nicht an Na^+ -Ionen gebunden ist, vielmehr muß er auf Veränderungen an der Membran beruhen.

Tasaki zeigt dies durch folgende Experimente (19):

- 1) An einer perfundierten Riesennervenfaser des Tintenfisches enthält das Außenmedium anstatt Na^+ -Ionen 150 mM CaCl_2 und 300 mM Hydrazinchlorid; das innere enthält statt K^+ -Ionen 90 mM NaF und 10 mM Cs-Phosphat Puffer. Unter dieser Bedingung, die stark vom natürlichen Ionenmilieu abweicht, entsteht trotzdem ein Aktionspotential. Dieses wird jedoch nicht weiter geleitet.
- 2) An einem nicht-perfundierten Axon, bei dem das Außenmedium nur Ca^{2+} -Ionen enthält, beobachtet man ebenfalls ein Aktionspotential.
- 3) Ersetzt man die Na^+ -Ionen im Außenmedium durch Li^+ -Ionen, so erfolgt die Depolarisation der Membran und der Verlauf des Aktionspotentials in ähnlicher Weise.
- 4) An einem Axon, das sich im natürlichen Ionenmilieu befindet, blockiert Tetrodotoxin (TTX) im Außenmedium den Na^+ -Einstrom. Das Gleiche kann man ebenfalls bei einem Axon, bei dem die Na^+ -Ionen durch Li^+ -Ionen ersetzt sind, beobachten. Dies bedeutet also, daß der Li^+ -Einstrom genauso wie der Na^+ -Einstrom durch TTX blockiert werden kann.

Alle diese experimentellen Befunde zeigen, daß unabhängig von der Anwesenheit von Na^+ -Ionen eine Veränderung an der Membran selbst für die Entstehung des Aktionspotentials verantwortlich sein muß. Diese Vorgänge hängen demnach mit Veränderungen der Membranstruktur, bzw. einer Konformationsumwandlung an Teilen der Membranstruktur zusammen (siehe Kapitel 3.5.).

3.3. Aktiver Transport

Wie in Kapitel 3.1. bereits erwähnt, ist die Axonmembran im Ruhezustand sowohl für K^+ -Ionen als auch für Na^+ -Ionen permeabel, und es findet eine Diffusion von Ionen entlang des jeweiligen Konzentrationsgefälles statt. Dies bedeutet, daß die Zellen im Laufe der Zeit K^+ -Ionen verlieren und Na^+ -Ionen akkumulieren. Damit gleicht sich die ursprüngliche, ungleiche Ionenverteilung zwischen Zellinnerem und äußerem Medium aus. Das Ruhepotential verschwindet und die Membran verliert ihre Fähigkeit, Aktionspotentiale herzustellen. Um die ungleiche Ionenverteilung aufrechtzuerhalten und damit das Aktionspotential herzustellen, muß also ein besonderer Mechanismus an der Axonmembran vorhanden sein. Durch diesen Mechanismus müssen Na^+ - und K^+ -Ionen unter Zufuhr von Energie gegen ihr Konzentrationsgefälle durch die Membran transportiert werden. Dieser Mechanismus wird aktiver Transport genannt und häufig auch als Na^+ -Pumpe bezeichnet.

Um diesen Mechanismus genau zu beschreiben, wurden bereits folgende Experimente durchgeführt:

- 1) Durch Anwendung von markierten Na^+ -Ionen und von Stoffwechsellinhibitoren, wie z.B. Dinitrophenol oder Cyanid, die den aktiven Transport reversibel ausschalten (23), wurde nachgewiesen, daß energiereiche Phosphate als Energielieferanten für den aktiven Transport dienen (24, 25). Bemerkenswert ist dabei, daß diese Aufgabe von nicht allen energiereichen Phosphaten erfüllt werden kann. So läßt sich der blockierte aktive Transport durch intrazelluläre Injektion von ATP oder Argininphosphat wieder anschalten. Kreatinphosphat dagegen, das bei der

Hydrolyse besonders viel freie Enthalpie zur Verfügung stellt, bewirkt dies nicht (25). Argininphosphat wirkt sehr wahrscheinlich indirekt über die Phosphorylierung von ADP. Damit spielt also ATP beim aktiven Transport eine besondere Rolle.

- 2) Ein zweiter, sehr wichtiger Befund ist, daß die Wirksamkeit des aktiven Transports sowohl durch die intrazelluläre Na^+ -Konzentration als auch durch die extrazelluläre K^+ -Konzentration automatisch reguliert wird (26). Diesen an Na^+ - und K^+ - gekoppelten Mechanismus des aktiven Transports haben Skou (27) und Backer et al. (28) genauer untersucht. Skou (29) isolierte aus einer mikrosomalen Fraktion des Krebsnerves ein Enzym, das bei Anwesenheit von Mg^{2+} -, Na^+ - und K^+ - Ionen ATP zu ADP und anorganischen Phosphat hydrolysiert, und dessen Aktivität durch Ouabain gehemmt wird. Ferner wurde die Na^+ - und K^+ - ionenabhängige Aktivität dieser ATPase von demselben Autor untersucht (Abb. 8). Statt in mikrosomalen Fraktionen wurde dann an Axonmembranen die Anwesenheit dieser ATPase von Backer (28) an Riesennervenfasern des Tintenfisches tatsächlich nachgewiesen. Dieser Autor bestimmte durch kolorimetrische Messung die pro Zeiteinheit freigesetzte Menge anorganischen Phosphats und damit die Phosphataseaktivität. Sie fanden, daß die ATP-Spaltung im intakten Nerv um ungefähr 25% höher ist als im Axoplasma.

Der aktive Transport wird hiernach durch Transport-ATPasen bewirkt. Weiter wurde gezeigt (30), daß bei Anwesenheit von Na^+ - Ionen das Membranprotein phosphoryliert und bei Anwesenheit von K^+ - Ionen dephosphoryliert wird.

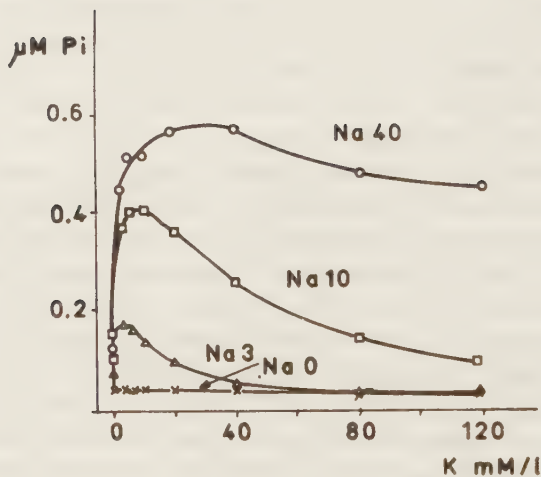


Abb. 8 : K^+ -Effekt auf die Aktivität der ATPase aus dem Krebsnerv in Anwesenheit von $6 \text{ mM Mg}^{2+}/\text{l}$ + 0 mM , 3 mM , 10 mM und $40 \text{ mM Na}^+/\text{l}$

Schließlich konnten Post et al. (31) (Abb. 9) durch umfangreiche Versuche nahelegen, daß das Protein zwischen der Phosphorylierung und Dephosphorylierung eine Konformationsumwandlung erfährt. Soweit sind die Vorgänge beim aktiven Na^+ - K^+ Transport bekannt.

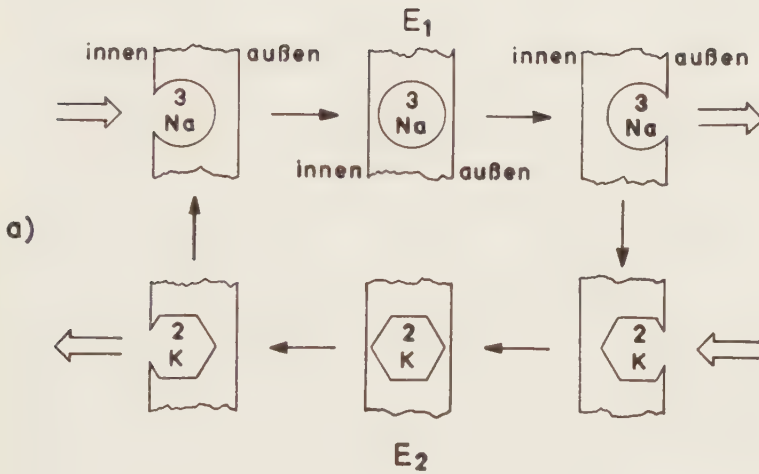


Abb. 9 a) : Transport der Na⁺- bzw. K⁺-Ionen durch die Membran und dabei möglicherweise entstehende Konformationsänderung der Na⁺-K⁺ ATPase (Kationen werden direkt an ATPase gebunden).

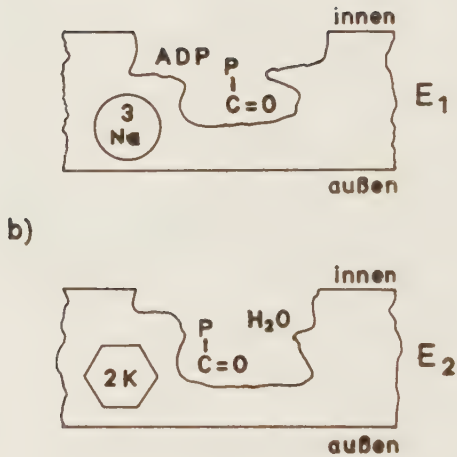


Abb. 9 b : Hypothetische Konformationsänderung der Na⁺-K⁺ ATPase bei Phosphorylierung und Dephosphorylierung unter Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen.
E₁ : Konformation bei Phosphorylierung
E₂ : Konformation bei Dephosphorylierung

3.4. Ionenkanal

Die Änderung der Ionenpermeabilitäten der Axonmembran verursacht die Entstehung des Aktionspotentials (siehe Kapitel 3.2.). Diese Beobachtung führte zu folgender Vorstellung: Es muß an der Membran ein spezieller Bereich vorhanden sein, durch welchen die Na^+ - und K^+ - Ionen während des Erregungsvorgangs jeweils in das Axoplasma hinein- bzw. aus ihm herausströmen (32). Dieser Bereich wird meist als Ionenkanal bezeichnet. Man muß jedoch den Begriff "Kanal" sehr kritisch betrachten. Man kann sich darunter einfache Bereiche der Membran vorstellen, die eine kooperative Konformationsumwandlungen erfahren wodurch eine Änderung der Ionenpermeabilität stattfindet. In meiner Arbeit wird dieser Bereich als "Kanal" bezeichnet, da diese Bezeichnung in der Biophysik häufig verwendet wird.

Man verwendet für die Untersuchung dieses Ionenkanals neuroaktive Substanzen, die den Na^+ - bzw. den K^+ - Strom blockieren (33). Mittels dieser Blockierungssubstanzen hat man festgestellt, daß verschiedene Kanäle für Na^+ - und für K^+ -Ionen vorhanden sein müssen (34).

3.4.1. Na^+ - Kanal

Es ist bekannt, daß der Na^+ -Einstrom bei der Erregung durch TTX (35), Saxitoxin (STX) (35f, 36), UV-Licht (37) oder quaternäre Derivate des Lidocains (38) selektiv blockiert werden kann, ohne daß der K^+ -Ausstrom davon betroffen ist. Dabei zeigen die Experimente mit UV-Licht (37) besonders gut den Molekülaufbau des Na^+ -Kanals. Da UV-Licht speziell von Protein absorbiert wird, und da

dieses den Na^+ -Kanal inaktiviert, ist zu sehen, daß an diesem Kanal Proteine beteiligt sind.

Über die Struktur des Kanals wurde von Hille (39) folgende Hypothese aufgestellt: ionisierte Carboxylgruppen sind ein wichtiger Bestandteil des Na^+ -Kanals. Dies wurde durch folgende Experimente nahegelegt:

- 1) Hille untersuchte die Permeabilität verschiedener Ammoniumkationen. Vergleicht man die Permeabilitäten von Hydroxylamin und N-Methylhydroxylamin, so stellt man fest, daß Hydroxylamin mit den Carboxylgruppen an der Wand des Kanals Wasserstoffbrücken bilden kann. Diese Fähigkeit ist bei methylierten Ammoniumionen nicht vorhanden. Die relativ hohe Permeabilität von Hydroxylamin entsteht also durch die Bildung von H-Brücken, die dieses mit dem Kanal eingehen kann.
- 2) Weiter wurde diese Hypothese dadurch gestützt, daß TTX in folgender Weise den Na^+ -Einstrom blockiert: TTX kann in drei verschiedenen Formen vorliegen (Abb. 10). Im basischen Bereich liegt es in zwitterionischer Form vor. Im physiologischen pH-Bereich ist es positiv geladen und kann in zwei tautomeren Formen auftreten. Es wurde experimentell festgestellt, daß nur die positiv geladene Form aktiv ist (33). Die geladene Guanino-Gruppe des TTX spielt dabei für die Bindung eine entscheidende Rolle. Sie kann nämlich für Wasserstoff-Brücken als Proton-Donor dienen. Als Akzeptor am Na^+ -Kanal wirkt das O-Atom einer ionisierten Carboxylgruppe. Daß es sich dabei tatsächlich um Carboxylgruppen handelt, wurde inzwischen ebenfalls folgendermaßen experimentell nachgewiesen:

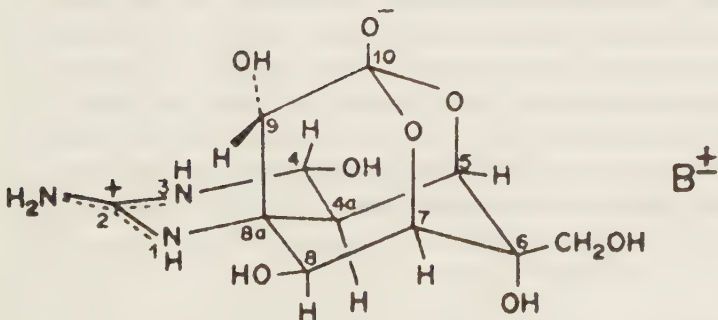
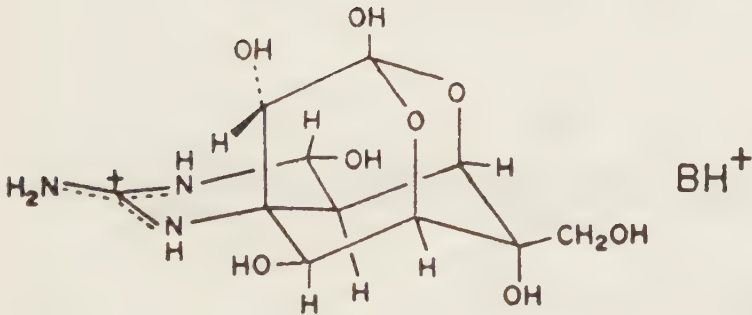
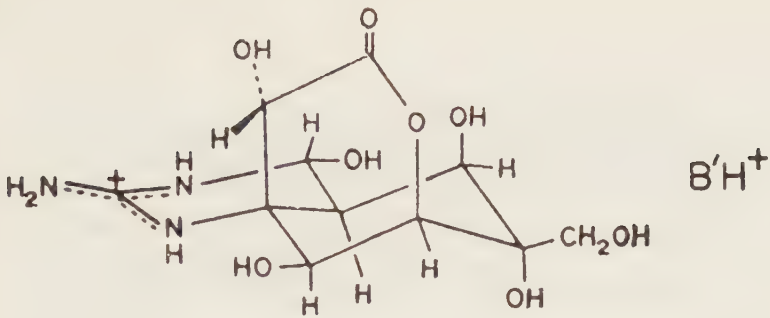
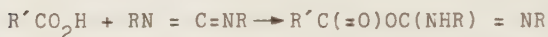


Abb. 10 : Struktur des TTX

- a) Das Carbodiimid bildet mit der Carboxylgruppe sehr stabile Derivate, wobei folgende Reaktion abläuft:



Damit bilden die mit EDC*(Abb. 11) behandelten Nervenfasern ca. 85 % weniger TTX als die unbehandelten (12). Dieses Experiment zeigt also, daß die Carboxylgruppe tatsächlich am Na⁺-Kanal vorhanden ist.

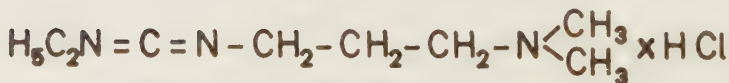


Abb. 11 : Struktur der EDC

- b) Neben diesen Experimenten mit Blockierungssubstanzen konnte man die Anwesenheit dieser Gruppe am Na⁺-Kanal auch auf folgende Weise zeigen: Es wurde die Erhaltung der Erregbarkeit bei fortgesetzter Reizung in Anwesenheit verschiedener anorganischer Kationen in extrazellulärem Medium untersucht. Die im extrazellulären Medium anwesenden Kationen begünstigen die Erhaltung der Erregbarkeit in folgender Reihenfolge (19):



*1-äthyl-3(3-dimethyl-aminopropyl) Carbodiimid · HCl

Diese Kationen bilden aber mit der Carboxylgruppe mehr oder weniger stabile Komplexe, wobei deren Stabilität in der obigen Reihenfolge abnimmt. Daher muß die Carboxylgruppe außen an der Membran und damit am Na^+ -Kanal eine maßgebliche Rolle spielen.

Ein weiterer Befund über die Struktur des Na^+ -Kanals wurde durch Anwendung quaternärer Derivate des Lidocains (Abb. 12) erbracht (38).

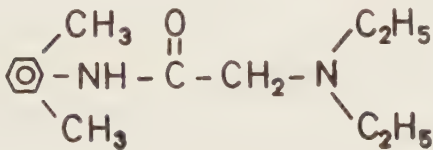


Abb. 12 : Struktur des Lidocains

Diese können ebenfalls den Na^+ -Einstrom blockieren. Sie wirken jedoch vom Axoplasma her, im Gegensatz zu TTX, welches nur von außen wirksam ist. Wichtig ist dabei, daß der Kanal vor der Anwendung des Lidocains geöffnet wird. Dies bedeutet, daß die Membran durch Spannungsklammer-Technik vor dem Test-Impuls bereits etwas depolarisiert werden muß. Die durch den Test-Impuls zustande gekommene Amplitude des Na^+ -Stroms wird dann unter verschiedenen Vordepolarisationsbedingungen verglichen. Je stärker und je

öfter die Membran vorher depolarisiert wird, desto schwächer wird die Amplitude des Na^+ -Einstroms (Abb. 13).

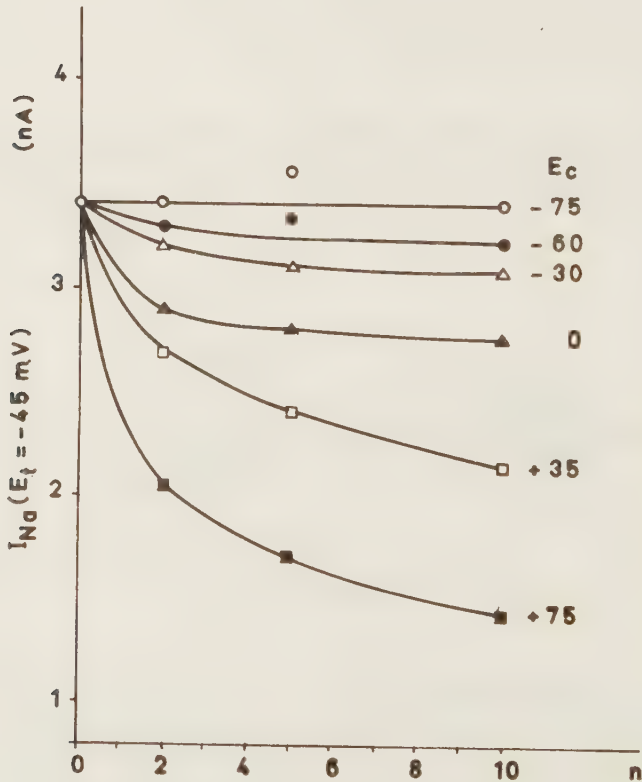


Abb. 13: Abhängigkeit des Na^+ -Einstroms von der Stärke der Vor-Depolarisationsspannung unter Anwesenheit des Lidocains

I_{Na} : Na^+ -Einstrom

E_c : Spannung der Vor-Depolarisation

E_t : Test-Spannung

n : Anzahl der Depolarisationsimpulse

Damit dringt das Lidocain sehr wahrscheinlich tief in den Kanal ein. TTX wird dagegen oberflächlich und zwar an der Außenseite der Membran gebunden. Damit wurde gezeigt, daß die beiden Öffnungen des Kanals unterschiedliche Strukturen haben müssen.

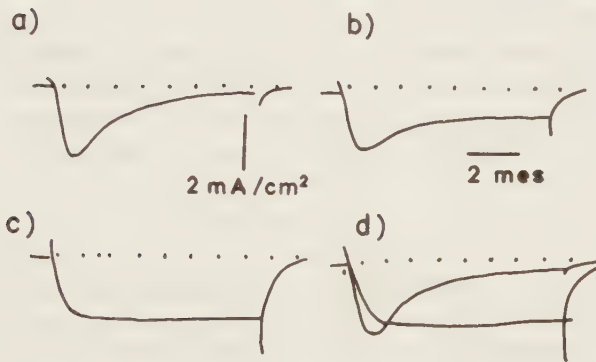


Abb. 14: Effekte der Pronase auf Na^+ -Einstrom: 1 mg Pronase/ml und 15mM TEA wurden in Axoplasma verwendet.

- a) 128 sek. nach der Pronase Perfusion
- b) 448 sek. "
- c) 724 sek. "
- d) a) und c) wurden zusammengestellt.

Durch Anwendung des proteolytischen Enzyms Pronase wurde nachgewiesen, daß man für die Schaltung des Na^+ -Ionenstroms zwei Mechanismen im Kanal annehmen muß (35e). Die Pronase wurde in das Axoplasma gebracht und der K^+ -Strom wird durch Tetraäthylammonium-Ionen (TEA) blockiert. Die Membran wurde dann darauf depolarisiert. Dabei war festzustellen, daß der Abfall des Na^+ -Einstroms umso langsamer wird, je länger die Pronase eingewirkt hat, bzw. je größer ihre Konzentration war. Der Anstieg des Na^+ -Einstroms wird dagegen nicht beeinflußt (Abb. 14). Damit müssen also zwei Mechanismen, nämlich ein Einschaltmechanismus (durch TTX blockierbar), der für den Anstieg der Depolarisation sorgt, und ein Abschaltmechanismus (durch Pronase zerstörbar), der nach der Depolarisation zur Wirkung kommt, vorhanden sein.

Hille (39a) postulierte, daß die Größe des Na^+ -Kanals $3 \times 5 \text{ \AA}$ beträgt. Dies wurde durch die relativen Permeabilitäten des Na^+ -Kanals für verschiedene Ammonium-Kationen festgestellt. Die relativen Permeabilitäten werden auf Na^+ -Permeabilität bezogen. Sie haben folgende Werte:

Ammoniumionen	relative Permeabilitäten
Hydroxylamin	0,94
Hydrazin	0,56
Ammonium	0,16
Formamid	0,14
Guanidin	0,13
Hydroxylguanidin	0,12
Aminoguanidin	0,06
Methyl-Derivate	0,06

Um die Erregbarkeit der Membran genau beschreiben zu können, ist es wichtig, neben der Struktur und dem Mechanismus des Kanals auch die Anzahl dieser Kanäle in der Axonmembran zu bestimmen. Dies kann mittels TTX durch den sog. Bioassay berechnet werden (33). Die Anzahl dieser Kanäle ist je nach Tierart unterschiedlich und liegt zwischen $10 - 200/\mu\text{m}^2$ (Tab. 2)

Preparation	Anzahl der Na^+ -Kanäle (pores/ μm^2)
Lobster walkin leg	13
Crab walking leg	49
Rabbit vagus	75
Lobster walking leg	36
Garfisch Olfactorius	215
Squid giant axon	200

Tabelle 2: Anzahl der Na^+ -Kanäle (4cb)

3.4.2. K^+ -Kanal

Der K^+ -Strom kann durch Alkylammoniumionen mit einem großen hydrophoben Rest, wie zum Beispiel dem Nonyltriäthylammonium-Ion (C_9) oder Tetraäthylammoniumion (TEA) blockiert werden (35e, 40), ohne daß der Na^+ -Einstrom davon beeinflusst wird. Der Blockierungsvorgang läuft dabei folgendermaßen ab: Zuerst werden Alkylammonium-Ionen in das Axoplasma gebracht, welche von außen nicht wirksam sind. Die Membran wird dann

durch Spannungsklammer-Technik depolarisiert. Man kann dabei einen Na^+ -Einstrom und dann einen K^+ -Ausstrom, der jedoch sofort abgebrochen wird, beobachten. Beim zweiten Versuch wurde TTX im extrazellulären Medium verwendet und Alkylammonium-Ionen in das Axoplasma gebracht. Die Membran wurde dann depolarisiert. Diesmal ist nur ein K^+ -Ausstrom zu beobachten, der aber ebenfalls gleich abgebrochen wird. Die Wirkung dieser Alkylammonium-Ionen ist umso stärker, je größer der hydrophobe Rest ist (40b). Diese Experimente zeigen, daß die K^+ -Blockierung im Gegensatz zur Na^+ -Blockierung auf der hydrophoben Wechselwirkung zwischen den Blockierungssubstanzen und dem K^+ -Kanal beruht. Ferner muß ihre Konzentration im Vergleich mit der von TTX (TTX erfordert nur 10^{-7} Mol/l) sehr groß sein, nämlich größer als 0,1 - 0,5 mMol/l. Im Bereich 0,06 - 0,21 mM/l nimmt die Wirkung der Blockierungssubstanzen noch mit der Konzentration zu (40b). Sie wird erst bei Konzentrationen von größer als 0,21 mM von der Konzentration unabhängig. Dies ist leicht verständlich, wenn man sich vorstellt, daß die Blockierungssubstanzen in die geöffneten Kanäle eindringen und diese verstopfen.

Eine besonders interessante Beobachtung bei der Blockierung des K^+ -Ausstroms ist folgende: der K^+ -Kanal kann sich durch einen eingepprägten Einwärtsstrom mittels Spannungsklammer-Technik von der Blockierung erholen. Das Membranpotential kann durch diesen eingepprägten Strom wieder auf seinen Ruhewert zurückgebracht werden. Danach wird die Membran erneut depolarisiert. Man beobachtet dann, daß der K^+ -Ausstrom kurzzeitig wieder ansteigt (40b). Dies bedeutet, daß die blockierende Substanz tatsächlich durch den eingepprägten Einwärtsstrom von ihrer Bindungsstelle verdrängt wird. Dieses Erholungsphänomen hängt erstens von der Natur der Alkylammonium-Ionen ab, zweitens besteht ein enger Zusammenhang mit

der Stärke des eingepprägten Stroms. Wenn die Membran hyperpolarisiert wird, also wenn das Membranpotential negativer als der Ruhewert wird, tritt die Erholung zwar zunächſt raſcher ein. Die vollſtändige Erholung erfolgt jedoch verzögert. Außerdem hängt die Erholung von der K^+ -Konzentration im Außenmedium ab. Je größer die K^+ -Konzentration ist, deſto ſtärker wird die Erholung beſchleunigt (40b).

Aus all dem kann man ſchließen, daß die Blockierungssubſtanſ ſelbſt direkt im Kanal gebunden wird, und daß damit ein ſpezieller Bereich für K^+ -Ionen, nämlich der K^+ -Kanal, an der Membran tatſächlich vorhanden iſt.

Besonders intereſſant iſt die Frage, welche Molekülgruppen an dieſem K^+ -Kanal beteiligt ſind. Man kann eine Abnahme des K^+ -Stroms bei zunehmender Protonierung beobachten. Dies zeigt, daß dieſe Molekülgruppen im K^+ -Kanal als Proton-Akzeptor dienen. Außerdem wurde eine Abnahme des K^+ -Stroms von Schrager (41) (durch Anwendung von Diäthylpyrocarbonat) bei der Carbethoxylation beobachtet und zwar inſbeſondere, wenn dieſe bei pH 6 durchgeführt wurde. Unter dieſer Bedingung reagiert aber Diäthylpyrocarbonat ſpezifisch mit den Hiſtidinreſten. Dies bedeutet, daß am K^+ -Kanal Hiſtidinreſte beteiligt ſind.

3.5. Oberflächenladung

Durch folgende Experimente konnte nachgewieſen werden, daß negative Oberflächenladung an der Axonmembran vorhanden iſt:

- 1) Durch Variation der H^+ -Konzentration im extrazellulären Medium wurde nachgewiesen, daß negative Oberflächenladung auch in der Nähe der Na^+ -Kanäle an der äußeren Seite der Membran vorhanden sein muß (42): Erhöht man nämlich die H^+ -Konzentration im extrazellulären Medium, so wird eine Abnahme des Na^+ -Einstroms beobachtet. Dies bedeutet, daß die negative Ladung in der Nähe des Na^+ -Kanals H^+ -Ionen gebunden hat und damit der Na^+ -Einstrom behindert wird.
- 2) Die negative Ladung an der Membranoberfläche konnte durch elektrophoretische Messungen direkt nachgewiesen werden (43). Unter Einfluß eines elektrischen Feldes bewegt sich das Axon entgegen der Feldrichtung. Dadurch ist bewiesen, daß negative Oberflächenladung an der Axonmembran tatsächlich vorhanden ist.
- 3) Ferner wurde gezeigt, daß die $-COO^-$ -Gruppen an der Außenseite der Membran bei der Oberflächenladung eine besondere Rolle spielen. Siehe dazu Kapitel 3.4..

Für die Struktur und die Funktion der erregbaren Membran ist die Oberflächenladung sehr bedeutend. So wird die Stabilität der Membran durch gegenseitige Abstoßung der Ladung an der Oberfläche beeinflusst (44). Diese kann Ladung aus der Umgebung binden und so werden die Ladungen mehr oder weniger neutralisiert (45). Ebenso hängt die elektrische Leitfähigkeit der Membran von der Oberflächenladung ab und wird durch spezielle geladene Gruppen in der Nähe der ionenselektiven Kanäle kontrolliert (46). Damit muß also die Oberflächenladung bei der Erregung eine wichtige Rolle spielen.

Interessant ist dabei zu wissen, wie diese Oberflächenladungen an der Axonmembran verteilt sind. Es gibt zwei Theorien über die Verteilung der Oberflächenladung (47):

1) Membran Inhomogeneity (Discrete Charge Modell)

Die Ladung ist in der Nähe der Ionenkanäle konzentriert

2) Membran Homogeneity (Uniform Charge Modell)

Die Ladung ist gleichmäßig über die ganzen Membranoberflächen verteilt.

Obwohl die erste Vorstellung als die wahrscheinlichere Verteilungsform der Ladung betrachtet wird, verwendet man trotzdem häufig das zweite Modell zur Berechnung der Flächendichte der Oberflächenladung (47, 48). Drouin et al. (46) kombinierten beide Modelle zur Berechnung der Flächenladungsdichte für das myelinisierte Axon des Frosches. Sie unterschieden dabei zwischen sogenannten spezifischen und nicht-spezifischen Ladungen. Spezifische Ladungen entstehen dabei durch Dissoziation von Gruppen, die in der Nähe der Na^+ -Kanäle lokalisiert sind (Modell 1), während die nicht-spezifischen Ladungen gleichförmig über die Membranoberfläche verteilt sind (Modell 2). Diese Autoren führten Messungen der Abhängigkeit des Na^+ -Einstroms von der Kationen-Konzentration im extrazellulären Medium bei verschiedenen Clamp-Spannungen aus. Wenn die H^+ -Konzentration im extrazellulären Medium erhöht wurde, nahm nicht nur die Stärke des Na^+ -Einstroms ab, sondern auch die Lage des Maximums dieses Stroms wurde beeinflusst (Abb. 15).

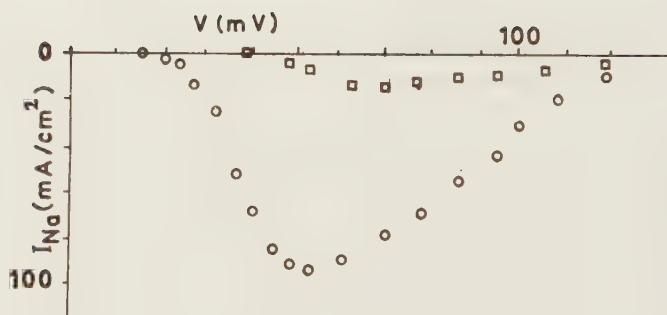


Abb. 15 : Effekt des niedrigen pH-Wertes auf die I_{Na} -V-Kurve
V: Depolarisationsspannung
○: Bezugskurve, $[Na^+]_a = 85$ mM, pH = 7,3
□: pH = 4,9

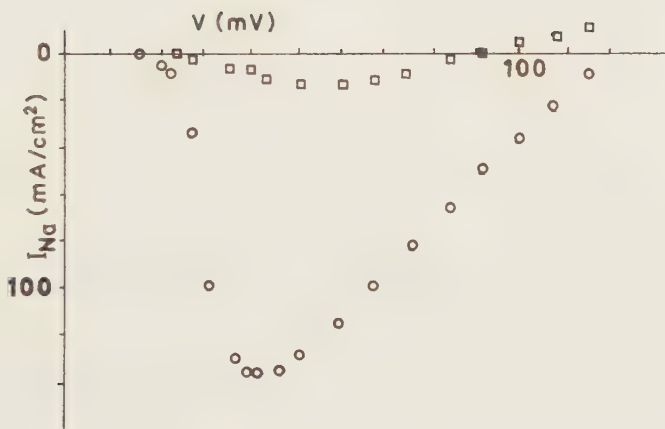


Abb. 16 : Effekt der niedrigen Na^+ -Konzentration auf
die I_{Na} -V-Kurve
o : Bezugskurve, $[Na^+]_a = 85$ mM, pH = 7,3
□ : $[Na^+]_a = 23$ mM

Verglichen mit der Referenzkurve wurde der maximale Wert des Na^+ -Einstroms erst bei hohem Membranpotential erreicht. Das gleiche Phänomen war auch zu beobachten, wenn die Na^+ -Konzentration im extrazellulären Medium erniedrigt wurde (Abb. 16). Anschließend wurden die Konzentrationen beider Kationen zugleich erniedrigt. Dabei war der gleiche Einfluß auf die I_{Na} -V-Kurve zu beobachten. Aus diesen Resultaten berechneten diese Autoren die Flächenladungsdichte und die pKa-Werte der beteiligten Gruppen. Sie erhielten dafür folgende Werte:

	Dichte	pKa
nicht-spezifische Oberflächenladung	$1 e_o / (20\text{\AA})^2$	4,3
spezifische Ober- flächenladung	$1 e_o / \text{Na}^+\text{-Kanal}$	4,5

Tabelle 3 zeigt weitere Ladungsdichten, die von anderen Autoren für verschiedene Membranen berechnet wurden.

Membran	Dichte ($1e_0/\text{\AA}^2$) nach Modell 1
Squid Axon	1/180
Crayfisch Axon	1/94
Myxicola Axon	1/110
Frosch Muskel	1/99
Barnacle Muskel	1/217

Tabelle 3: Dichte der Oberflächenladung an verschiedenen Membranen (47)

3.6 Konformationsänderung der erregbaren Membran

Wie bereits in Kapitel 3.2. erwähnt, müssen bei der Entstehung des Aktionspotentials Veränderungen der Struktur an der Membran selbst auftreten. Durch eine Konformationsumwandlung an Teilen der Membranstruktur muß die Permeabilitätsänderung verursacht werden. Zahlreiche Autoren haben sich mit Konformationsänderung bei erregbaren und nicht erregbaren Membran befaßt:

- 1) Bereits 1968 beobachteten Tasaki et al. (49) reversible Strukturänderungen des Membranproteins über Fluoreszenzänderung der am Axon adsorbierten Moleküle. Ferner stellten Tasaki und andere Autoren (19, 49, 50) die Hypothese auf, daß in den

erregbaren Membranen ionenabhängige Konformationsumwandlungen stattfinden.

- 2) Hsia et al. (51) beobachteten solche ionenabhängigen Konformationsumwandlungen an Plasmamembranen bei Spin-label-Experimenten.
- 3) Ein Jahr später zeigten Papakostidis et al. (52) den Ioneneinfluß auf die Membranstruktur mittels IR- und CD- Spektroskopie. Sie stellten Filme aus Axonmembranfraktionen des Rattenhirns her und untersuchten die Konformationen bei Anwesenheit von Na^+ -, K^+ - bzw. Ca^{2+} -Ionen. Dabei wurde gezeigt, daß bei Anwesenheit von K^+ -Ionen die Membranproteine zum Teil in β -Struktur vorliegen, während ansonsten α -helikale Strukturen vorherrschen.
- 4) Cohen und Keynes (53) gelang es, die rasche reversible Membranstrukturänderung bei Erregung über die Änderung der Lichtstreuung und der Doppelbrechung nachzuweisen.
- 5) Anhand von IR-spektroskopischen Untersuchungen zeigten Wallach et al. (54), daß eine pH-abhängige Konformationsumwandlung in Plasmamembranen stattfindet, aus denen die Lipide extrahiert worden waren. Dieses Ergebnis muß man jedoch sehr kritisch betrachten, da das Experiment unter sehr unnatürlichen Bedingungen ausgeführt wurde. Die Struktur der Membranproteine wird durch die Lipid-Extraktion beeinflusst.
- 6) Graham et al. (55) beobachteten eine Konformationsumwandlung bei ATP-Zugabe an Erythrocyten Membran-

fraktionen mittels IR-Spektroskopie. Dabei stellten diese Autoren eine Suspension her, wobei dieser ATP zugegeben wurde. Durch Einfrieren der Suspension wurde die ATP-Spaltung gestoppt. In diesem Zustand wurde dann das IR-Spektrum aufgenommen. Bei Anwesenheit von ATP, Na^+ -, K^+ - und Mg^{2+} -Ionen wurde eine große Aufspaltung der Amid I-Bande beobachtet (Abb. 17).

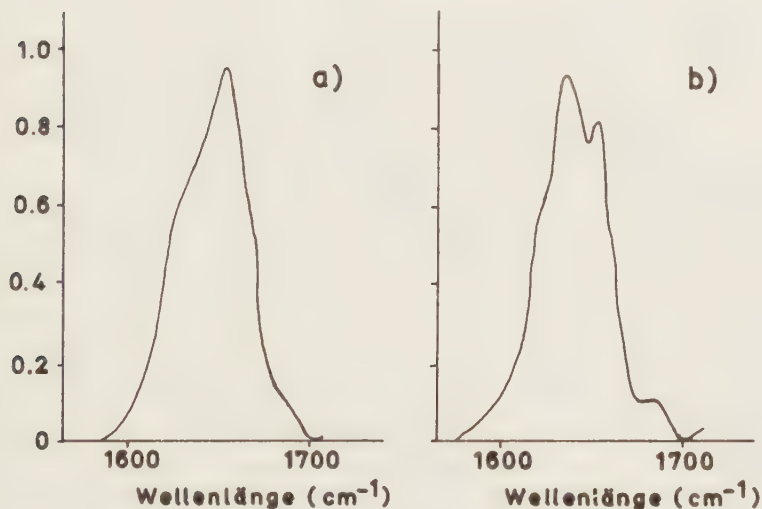


Abb.17 : Konformationsänderung der Erythrocytmembran in D_2O -Phosphat Puffer unter Anwesenheit von
a) 1,0 mM Mg^{2+}
b) 0,5 mM ATP + 1,0 mM Mg^{2+} + 25 mM Na^+ + 5mM K^+

Dies bedeutet, daß unter diesen Bedingungen ein großer Anteil des Membranproteins in β -Struktur vorliegt. In diesem Experiment haben die Autoren zwar durch enzymatischen Test nachgewiesen, daß die Enzymaktivitäten auch nach dem Einfrieren und der Rehydratation noch im wesentlichen erhalten waren (Tab. 4), jedoch ist fraglich, ob nicht die gesamte Membranstruktur durch das Einfrieren beeinflusst worden ist. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die Membran im gefrorenen Zustand in einer anderen Form vorliegt.

Preparation	M ATP/mg protein/st		Stimulation mit K^+ (%)
	$Mg^{2+} + Na^+$	$Mg^{2+} + Na^+ + K^+$	
Kontrolle Membran	0,410	0,562	37
Membran nach dem Gefrier- trocknen rehydrati- siert	0,650	0,862	33

Tab. 4: Aktivität der Na^+-K^+ -ATPase nach dem Gefriertrocknen an der Erythrocyte-Membran

- 7) Von Muralt (56) beobachtete am Olfactorius des Hechtes eine Änderung der Doppelbrechung während des Aktionspotentials (Abb. 18)

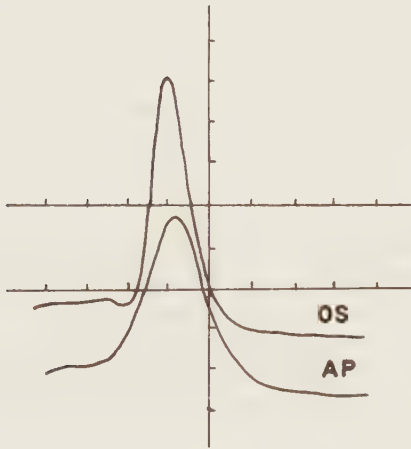


Abb. 18: Änderung der Doppelbrechung beim Durchlauf eines Aktionspotentials

OS = optische Änderung

AP = Aktionspotential

Obere Kurve : Ordinate, 1 Skalenteil = 1000 μ V

Abszisse, 1 Skalenteil = 560 mS

Untere Kurve: Ordinate, 1 Skalenteil = 5 mV

Abszisse, 1 Skalenteil = 560 mS

Am Olfactorius des Hechtes ist die Doppelbrechung (Doppelbrechung = $n_{\parallel} - n_{\perp} < 0$) negativ. Die beobachtete Zunahme und Abnahme der Doppelbrechung entspricht einer Abnahme beziehungsweise Zunahme der Entropie (56c).

- 8) Howarth et al. (57) stellten durch Enthalpiemessungen am Olfactorius des Hechtes fest, daß während des ansteigenden Teils des Aktionspotentials vom Axon Wärme freigesetzt wird, die im Verlauf des Potentialabfalls wieder absorbiert wird. Dies bedeutet, daß während des Anstiegs die Entropie abnimmt und während des Abfalls wieder zunimmt.

Vergleicht man die Versuche 7 und 8, so führt der ähnliche Verlauf der optischen und thermischen Effekte zu folgenden abschließenden Feststellungen: Bei der Erregung findet tatsächlich eine Konformationsumwandlung in der Axonmembran statt. Die Axonmembran muß im erregten Zustand in geordneterer Form vorliegen als im Ruhezustand (56c).

4. Eigene Messungen, Ergebnisse und Diskussion

4.1. Konformationsuntersuchungen

Das IR-Spektrum gibt Auskunft über die Sekundärstruktur der Membranproteine. Die häufigsten Sekundärstrukturen, α -Helix, β -Struktur und ungeordneter Zustand (Knäuel) verursachen folgende Amid I- und Amid II-Banden (58):

Konformation	Amid I $[\text{cm}^{-1}]$	Amid II $[\text{cm}^{-1}]$
Knäuel	1658 s	1520 s
α -Helix	1650 s	1516 w 1546 s
β -Struktur parallel	1648 w 1632 s	1530 s 1550 w
β -Struktur antiparallel	1685 w 1632 s 1668 vw	1530 s 1510 w 1550 w

Tabelle 5: Bandenzuordnung von Amid I und II

s: stark, w: schwach, vw: sehr schwach

Zunächst möchte ich die Konformation der Proteine in den erregbaren Membranen betrachten und mit der der Proteine im Myelin vergleichen (Abb. 19)

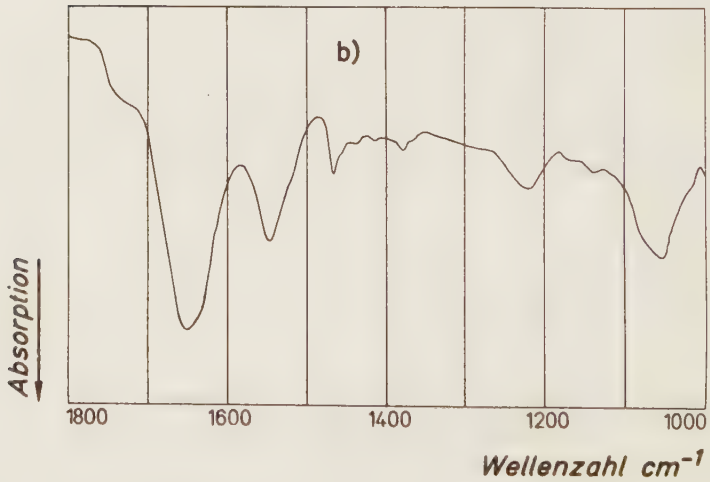
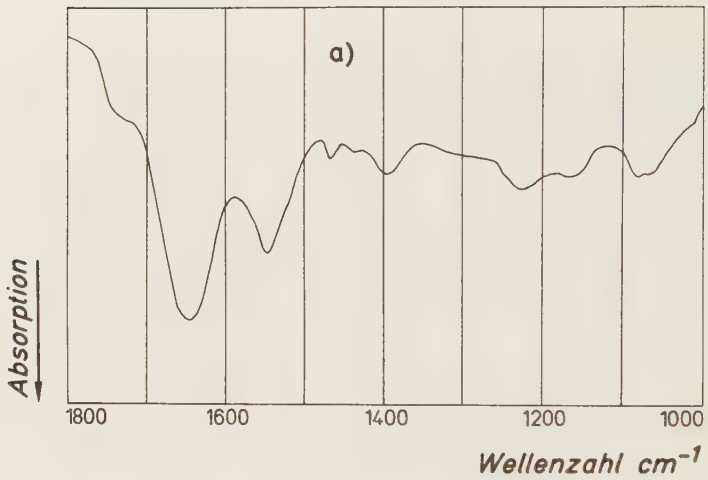


Abb. 19: IR-Spektren von

a) Axonmembran in Na^+ -Kakodylat Puffer (H_2O)

b) Myelinmembran in Na^+ -Kakodylat Puffer (H_2O)

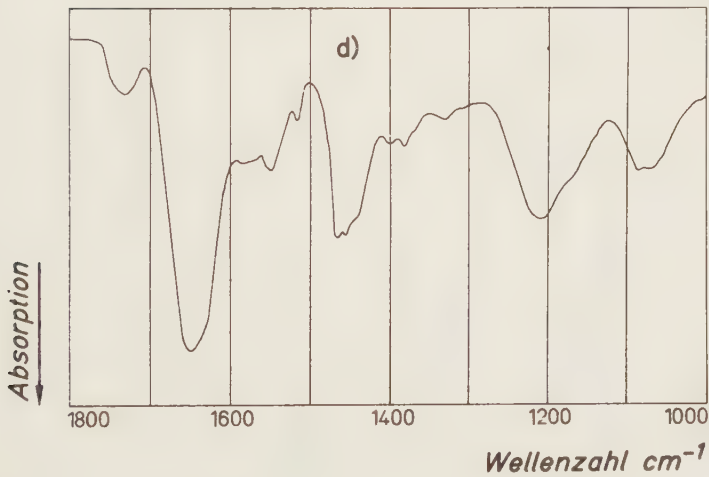
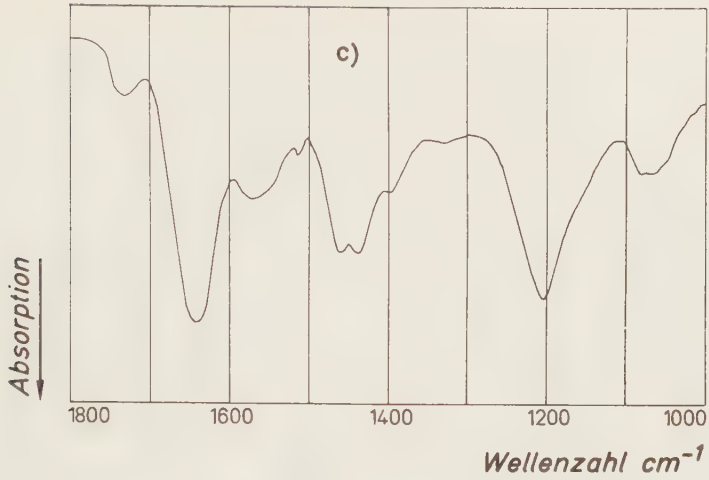


Abb. 19: IR-Spektren von

c) Axonmembran in Na^+ -Kakodylat Puffer (D_2O)

d) Myelinmembran in Na^+ -Kakodylat Puffer (D_2O)

4.1.1. Kationenabhängigkeit

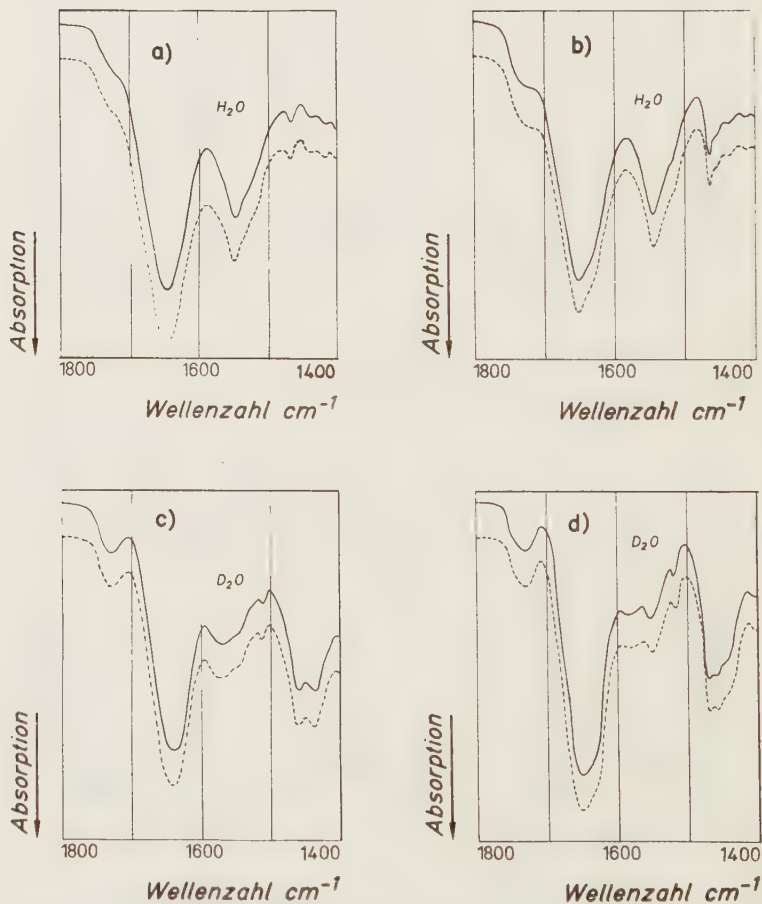


Abb. 20: IR-Spektren von

Axonmembran ohne EDTA-Behandlung a) und c)

Myelinmembran ohne EDTA-Behandlung b) und d)

— mit Na⁺-Ionen, --- mit K⁺-Ionen

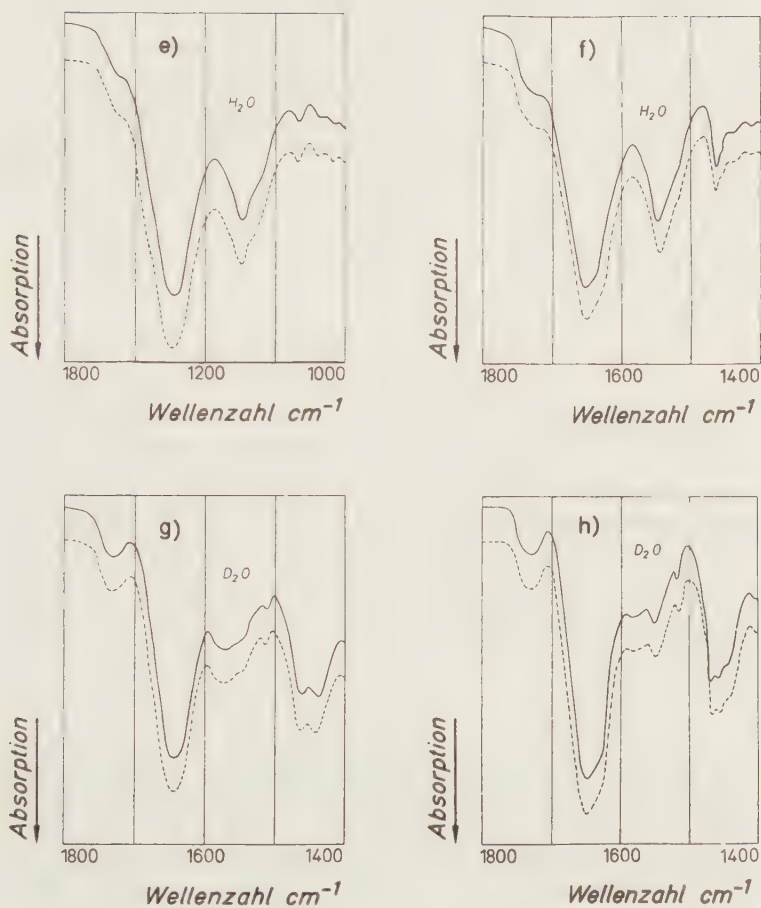


Abb. 20: IR-Spektren von

Axonmembran mit EDTA-Behandlung e) und g)

Myelinmembran mit EDTA-Behandlung f) und h)

— mit Na⁺-Ionen, --- mit K⁺-Ionen

In Abb. 19 werden diese Spektren gegenübergestellt.

Im Fall der Fraktion an erregbaren Membranen liegt die Amid I-Bande bei 1650 cm^{-1} (in D_2O 1646 cm^{-1}) und die Amid II-Bande bei 1545 cm^{-1} (in D_2O 1455 cm^{-1}) mit einer schwachen Schulter bei 1520 cm^{-1} . Im Fall des Myelins beobachtet man die Amid I -Bande ebenfalls bei 1650 cm^{-1} (in D_2O 1646 cm^{-1}). Diese Bande zeigt jedoch eine deutlich Schulter bei 1630 cm^{-1} , die im Spektrum der deutierten Probe besonders deutlich zu erkennen ist. Die Amid II-Bande liegt bei 1545 cm^{-1} mit einer schwachen Schulter bei 1520 cm^{-1} .

Diese Bandenlagen zeigen, daß im Fall der erregbaren Membranen unter den vorliegenden Bedingungen die Membranproteine weitgehend helikal sind. Die schwache Schulter bei 1520 cm^{-1} zeigt einen kleinen Anteil von Membranproteinen im geknäulten Zustand an. Die Konformation der Membranproteine des Myelins unterscheidet sich unter den vorliegenden Bedingungen von derjenigen der Proteine der erregbaren Membranen dadurch, daß man auch einen β -Strukturanteil beobachtet. Dies zeigt die zusätzlich beobachtete Schulter bei 1630 cm^{-1} .

Ein anderer charakteristischer Unterschied zwischen den Spektren der erregbaren Membranen und denen des Myelins besteht darin, daß bei Myelin die Banden bei 1232 cm^{-1} und 1077 cm^{-1} wesentlich intensiver sind. Bei diesen Banden handelt es sich um die Schwingungen der >PO_2^- Ionen der Phospholipide (59). Damit zeigt dieser Befund, daß das Myelin im Vergleich mit erregbaren Membranen weit mehr Phospholipide enthält, wie auch aus der Literatur bekannt ist (60).

Sowohl bei den Vesikeln an erregbaren Membranen als auch bei denen des Myelins habe ich die IR-Spektren bei Anwesenheit von Na^+ - bzw. K^+ -Ionen in H_2O und in D_2O aufgenommen. Ferner verglich ich die Spektren dieser Proben bei Anwesenheit zweiwertiger Kationen, insbesondere Ca^{2+} -Ionen, mit denen der Probe, die vorher mit EDTA-Lösung dialysiert worden ist. Abb. 20 zeigt alle diese Spektren.

In all diesen Spektren findet man die Amid I-Bande bei 1650 cm^{-1} (in D_2O 1646 cm^{-1}) und die Amid II-Bande bei 1545 cm^{-1} mit einer schwachen Schulter bei 1520 cm^{-1} . Im Fall der deuterierten Probe liegt die Amid II-Bande bei 1455 cm^{-1} . Der Vergleich all dieser Spektren zeigt, daß weder die Lage noch die Intensität dieser Amid-Banden unter den vorliegenden Bedingungen sowohl im Fall der Vesikeln aus dem Olfactorius als auch im Fall des Myelins von der Natur der anwesenden Kationen abhängig ist.

4.1.2 pH-Abhängigkeit

Abb. 21 zeigt die Spektren in Abhängigkeit von pH- bzw. pD-Werten. Im Fall der Vesikeln aus erregbaren Membranen, die in H_2O hydratisiert sind, ist zu beobachten, daß mit abnehmendem pH-Wert an der Amid I-Bande eine Schulter bei 1630 cm^{-1} auftaucht, die die Ausbildung der β -Struktur anzeigt. Die Schulter ist bei $\text{pH} = 4,2$ bereits deutlich sichtbar und wird immer kräftiger bis zu pH-Werten von 3,0. Bei noch tieferen pH-Werten bleibt sie unverändert. Diese Schulter verschwindet wieder durch die Zurückdialyse auf $\text{pH} = 7,4$.

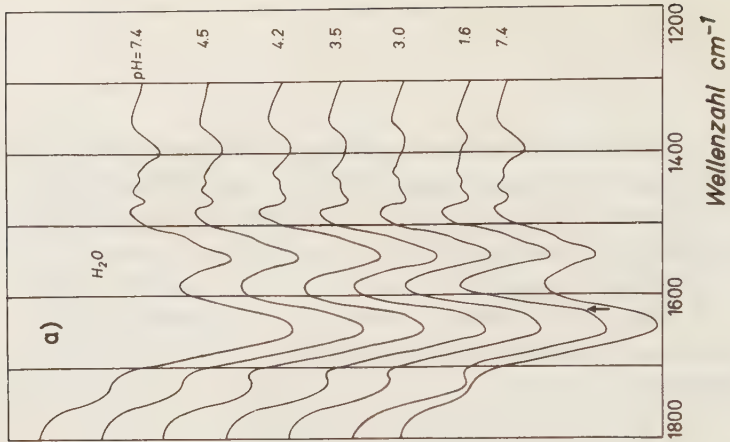
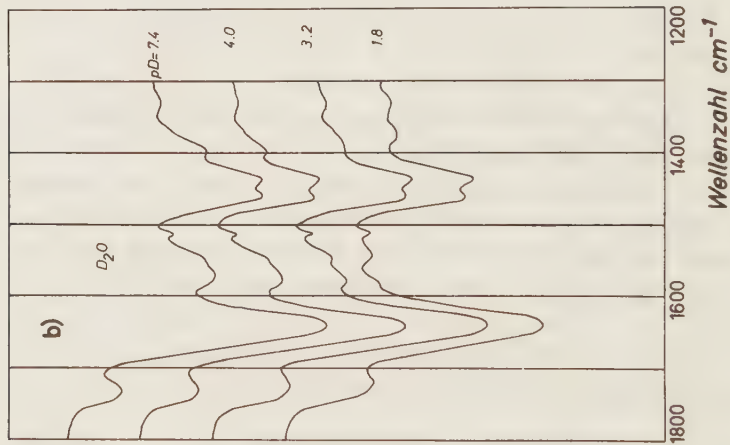
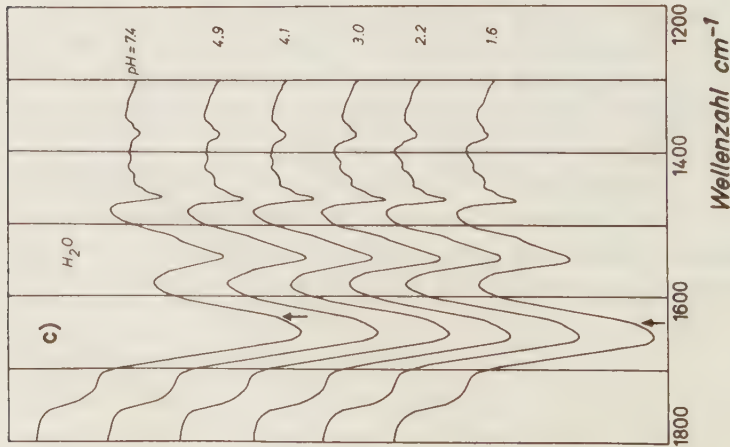


Abb. 21: IR-Spektren von
 a) Axonmembran in H_2O , b) Axonmembran in D_2O , c) Myelin in H_2O
 in Abhängigkeit vom pH- bzw. pD-Wert mit Na^+ -Kakodylathaltiger Lösung

Hiernach erfolgt die Ausbildung der β -Struktur in pH-Bereich von 4,5 - 3,0. Außerdem sieht man, daß diese Konformationsumwandlung reversibel ist.

Wie wir im Kapitel 4.2. sehen werden, protonieren sich die Carboxylgruppen im pH-Bereich von 4,5 - 2,0. Es ist hiernach anzunehmen, daß die beobachtete Konformationsumwandlung im Zusammenhang mit dieser Ladungsänderung der Membranproteine und damit der Membran selbst steht. Diese Vorgänge sind unabhängig davon, ob Na^+ - oder K^+ -Ionen anwesend sind.

Eine Untersuchung des pH-Einflusses auf den Ladungszustand der Axonmembran wurde von Hille et. al. (42) und Schragar (41) durchgeführt: wird die H^+ -Konzentration im Außenmedium erhöht, so nimmt die negative Oberflächenladung der Axonmembran ab, gegebenenfalls bis zur Neutralisierung. Dadurch wird eine Änderung des Membranpotentials hervorgerufen und eine höhere Depolarisation erforderlich um die Membran zu erregen. Hieraus schließen diese Autoren, daß die durch die Zunahme der H^+ -Konzentration zustande gekommene Änderung der elektrischen Feldstärke eine kleine Änderung der Sekundärstruktur des Membranproteins verursacht. Dies entspricht der von mir an der Axonmembranfraktion beobachteten Konformationsumwandlung (Abb. 21a).

Wenn die Membranvesikel D_2O -hydratisiert und die austauschbaren H^+ -Ionen in den Proteinen durch D^+ -Ionen ersetzt sind (Abb. 21 b), tritt bei Erniedrigung des pD diese Schulter nicht auf. Dies bedeutet, daß sich keine β -Struktur unter diesen Bedingungen bildet.

Im Fall des Myelins (Abb. 21 c) ist - wie bereits diskutiert - die die β -Struktur anzeigende Schulter bereits bei pH 7,4 vorhanden. Mit abnehmendem pH-Wert ändert sich an dieser Schulter nichts. Somit tritt mit abnehmendem pH-Wert keine Konformationsumwandlung ein; d. h. die Struktur des Myelins ist gegenüber Änderungen des pH-Wertes sehr unempfindlich.

4.1.3. Vergleich der Konformation der Axonmembranvesikeln in Kakodylat-Puffer mit der der Axonmembranvesikeln in Phosphat-Puffer

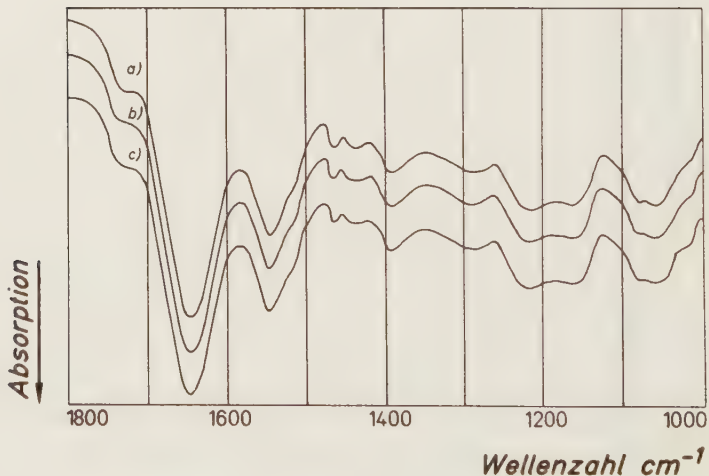


Abb. 22: IR-Spektren der Axonmembran (H_2O)

- a) in Phosphat-Puffer ohne Ca^{2+} -Ionen pH 7,4
- b) in Phosphat-Puffer nur mit K^{+} -Ionen pH 7,4
- c) in Phosphat-Puffer nur mit Na^{+} -Ionen pH 7,4

Da das Kakodylat im biologischen Gewebe im natürlichen Zustand nicht vorhanden und darüber hinaus giftig ist, entsteht hier die Frage, ob das Kakodylat auf die Sekundärstruktur einwirkt. Um dies zu klären, habe ich IR-Spektren der Axonmembranfraktion mit entsprechenden Puffers aufgenommen, bei denen das Kakodylat durch Phosphat ersetzt war.

Untersucht habe ich Vesikel in:

- 1) Phosphat Puffer ohne Ca^{2+} -Ionen
- 2) Phosphat Puffer nur mit K^{+} -Ionen
- 3) Phosphat Puffer nur mit Na^{+} -Ionen

Diese Spektren zeigt Abb. 22. Der Vergleich der Spektren im Phosphat-Puffer mit der im Kakodylat-Puffer zeigt (siehe Abb. 20a und e), daß die Konformation durch das Kakodylat nicht beeinflußt wird.

4.1.4. Konformation bei natürlichem Ionenmilieu

Ich habe das physiologische Ionenmilieu möglichst weitgehend an das des Garfisches angenähert. Da das physiologische Ionenmilieu des Hechtes nicht vollständig geklärt ist, habe ich aus folgenden Gründen das des Garfisches (61) verwendet: Der Garfisch ist ebenfalls ein Süßwasserfisch und beide gehören der selben Familie an. Der Olfactorius des Garfisches ist ebenfalls unmyelinisiert. Das Ergebnis wird in Abb. 23 gezeigt.

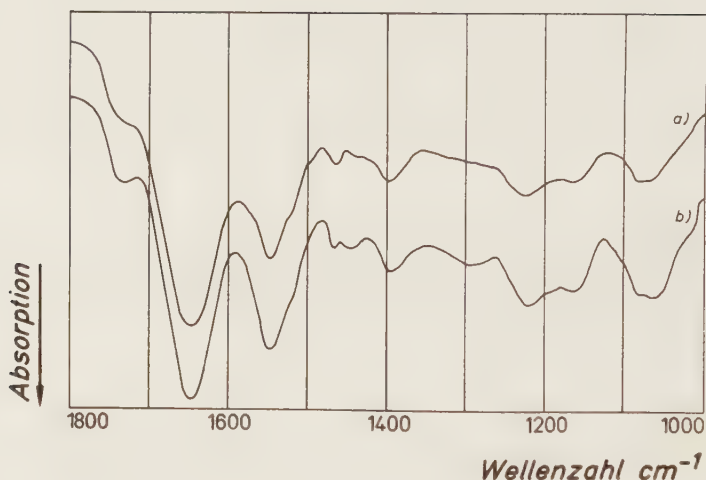


Abb. 23: IR-Spektren der Axonmembran

a) in H₂O-Kakodylat Puffer pH 7,4

b) in H₂O-physiologischer Lösung pH 7,4

Der Vergleich der Spektren 23a) und 23 b) zeigt, daß bei der sog. physiologischen Lösung die selbe Konformation der Membranproteine vorliegt.

4.1.5. ATP-Zugabe

Ein von Graham et al. (55) an Erythrocyte-Membranen beobachtetes Phänomen habe ich an der Axonmembran untersucht. Diese Autoren zeigten, wie bereits in Kapitel 3.6. erwähnt, daß ein großer Teil der Membranproteine bei Zugabe von ATP in Anwesenheit von Na⁺-, K⁺- und Mg²⁺-Ionen

in β -Struktur übergeht (dieses Spektrum wurde jedoch im gefrorenen Zustand der Membranvesikeln aufgenommen).

Bei meinen Untersuchungen lagen die Axonmembranvesikel in folgendem Ionenmilieu vor: 125 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 + 100 mM NaCl + 20 mM KCl + 5 mM MgCl_2 . Dieses Ionenmilieu wählte ich, da, wie ich zeigen konnte, die Membranvesikeln unter diesen Bedingungen hohe $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase-Aktivität zeigten (70%). Nach der Aufnahme des Spektrums der Axonmembranvesikeln ohne ATP-Zugabe führte ich der Substanzküvette rasch 0,5 ml von der aus 100 mM NaCl + 20 mM KCl + 5 mM MgCl_2 + 3 mM Tris_2ATP bestehenden Lösung zu und nahm

- 1) unmittelbar danach
- 2) nach 5 Minuten
- 3) nach 20 Minuten

die Spektren des interessierenden Bereichs auf. Diese Spektren zeigt Abb. 24. In keinem Fall war eine Veränderung an den Amid-Banden erkennbar, die auf ein Entstehen der β -Struktur hingedeutet hätte.

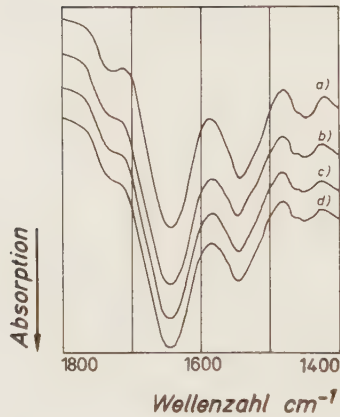


Abb. 24: IR-Spektren der Axonmembran mit ATP-Zugabe

- a) ohne ATP Zugabe
- b) nach der ATP Zugabe sofort gemessen
- c) 5 min. nach der ATP Zugabe gemessen
- d) 20 min. nach der ATP Zugabe gemessen

4.1.6. Pellet-Fraktion

Um zu prüfen, ob die pH-abhängige Konformationsumwandlung, die ich bei Axonmembranvesikeln beobachtete, für diese charakteristisch ist, untersuchte ich auch die Pellet-Fraktion in Abhängigkeit vom pH-Wert. Das Ergebnis zeigt Abb. 25

Die Amid-Banden in dieser Abbildung zeigen, daß das Membranprotein in diesen Vesikeln im untersuchten pH-Bereich keine Konformationsänderungen in Abhängigkeit vom pH-Wert erfährt. Hiernach ist die bei Axonmembranvesikeln beobachtete Konformationsumwandlung von Proteinen in β -Struktur für diese Vesikeln charakteristisch.

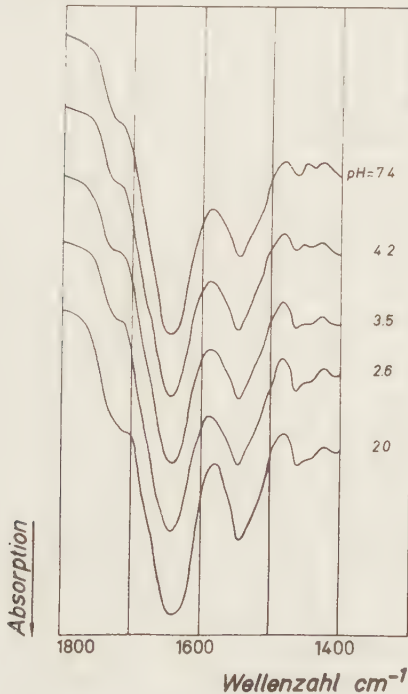


Abb. 25: IR-Spektren der Pellet-Fraktion in Abhängigkeit vom pH-Wert

4.2. -COO⁻ Gruppe

Wie ich bereits in den vorigen Kapiteln berichtete, sind die -COO⁻ Gruppen für die Oberflächenladung sehr wichtig und spielen auch für den Na⁺-Kanal eine große Rolle. Daher habe ich die Carboxylgruppen bei der Axonmembranfraktion des Olfactorius des Hechtes und bei Myelin näher untersucht.

IR-Banden der Carboxyl-Gruppen findet man im Bereich 1800 cm⁻¹ - 1000 cm⁻¹ bei folgenden Wellenzahlen (62):

Gruppierung	Schwingung	Wellenzahlenwert cm ⁻¹
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\nu_{\text{C}=\text{O}}$	1725 s
$\begin{array}{c} \text{O}^- \\ \parallel \\ -\text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	ν_{as}	1575 m (nur in D ₂ O zu beobachten)
$\begin{array}{c} \text{O}^- \\ \parallel \\ -\text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	ν_{s}	1400 w
$\begin{array}{c} \text{C} \\ \parallel \\ -\text{C} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	ν_{CO} und δ_{OH}	Bandenpaar im Bereich 1400 - 1000 w

ν_{s} : sym. Valenzschwingung

ν_{as} : asym. Valenzschwingung

δ : Deformationsschwingung

Die $\nu_{\text{as-COO}^-}$ Bande wird bei H_2O -Suspension von der Amid II-Bande verdeckt. (Abb. 21 a). Daher kann man sie nur in D_2O -Suspension beobachten. Dagegen ist die $\nu_{\text{s-COO}^-}$ Bande in D_2O -Suspension wegen der nach niedrigen Wellenzahlen verschobenen Amid II-Bande nur noch als Schulter zu finden (Abb. 21c). Um die Anwesenheit und die Bandenlagen der $-\text{COO}^-$ Gruppen bei den Axonmembranvesikeln genauer zu ermitteln, protonierte ich die Membranvesikeln zunächst mit HCl . Dabei ging ich von der Suspension des Na^+ -Kakodylat-Puffer ($\text{pH} = 7,4$) aus. Die erhaltenen Spektren zeigt Abb. 26

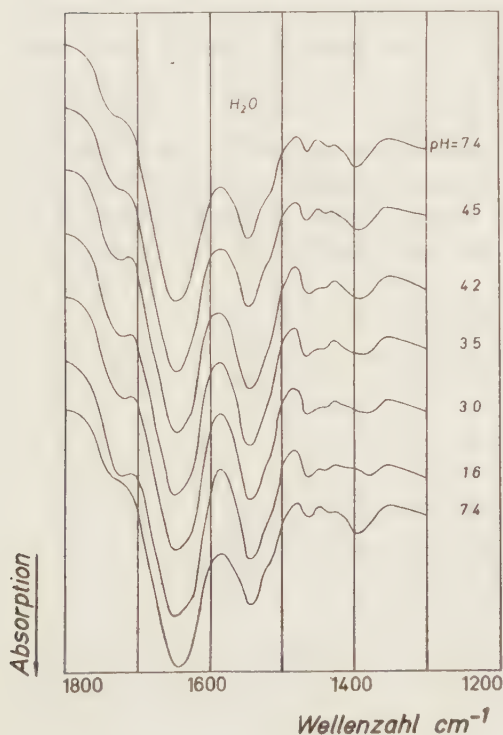


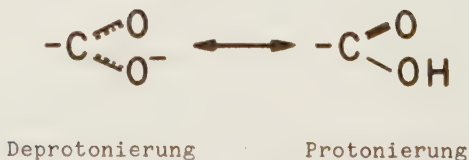
Abb. 26:
Abhängigkeit der
 $-\text{COO}^-$ Gruppe vom
 pH -Wert

Bei zunehmender Protonierung kann man folgendes beobachten:

- 1) Die Bande bei 1400 cm^{-1} verschwindet allmählich.
- 2) Die Intensität bei 1580 cm^{-1} nimmt ebenfalls ab.
Dies kommt dadurch zustande, daß die $\nu_{\text{as}}\text{-COO}^-$ Bande, die zwar wegen der starken Amid II-Bande selbst nicht zu erkennen ist, durch die Protonierung an Intensität verliert.
- 3) Neben dem Verschwinden bzw. der Intensitätsabnahme dieser Banden erkennt man, daß die $\nu_{\text{C=O}}$ Bande bei 1723 cm^{-1} an Intensität zunimmt.
- 4) Ferner sieht man, daß eine schwache Bande bei 1380 cm^{-1} erscheint, die ebenfalls den -COOH Gruppen zuzuschreiben ist.

Die Intensitäten der Banden nehmen durch Zurückdialyse mit Na^+ -Kakodylat-Puffer pH 7,4 wieder bis auf ihr Anfangsniveau zu bzw. ab. Hiernach sind diese Veränderungen bei Protonierung und Deprotonierung völlig reversibel.

Alle diese Veränderungen in den Spektren zeigen die Protonierung bzw. Deprotonierung der Carboxylgruppen in den Membranvesikeln an.



Um sicher zu sein, daß es sich tatsächlich um Carboxyl-Gruppen handelt, deren Protonierung diese Veränderungen im Spektrum verursacht, wurden die Membranvesikeln mit EDC behandelt. Wie ich im Kapitel 3.4. beschrieben habe, bilden die -COO^- Gruppen mit Carbodiimid ein stabiles Derivat. Das Spektrum der so behandelten Membranvesikeln zeigt Abb. 27a. Zum Vergleich ist in Abb. 27 b das Spektrum einer wässrigen Lösung von EDC wiedergegeben. Im Spektrum der EDC liegen um 1400 cm^{-1} keine Banden der angelagerten Gruppierung vor. Damit wird die Bande der Vesikel um 1400 cm^{-1} von EDC-Banden nicht verdeckt. In Abb. 27 a sieht man, daß die Bande bei 1400 cm^{-1} bei der Reaktion mit EDC verschwindet. Dies beweist, daß es sich bei der Bande um 1400 cm^{-1} tatsächlich um eine Schwingung des Carboxyl-Ions und damit, wie bereits diskutiert, um Vs -COO^- handelt. Die Reaktion zwischen EDC und -COO^- Gruppen ist jedoch nicht reversibel, denn es ist ja ein stabiles Derivat zwischen den beiden Gruppierungen gebildet worden.

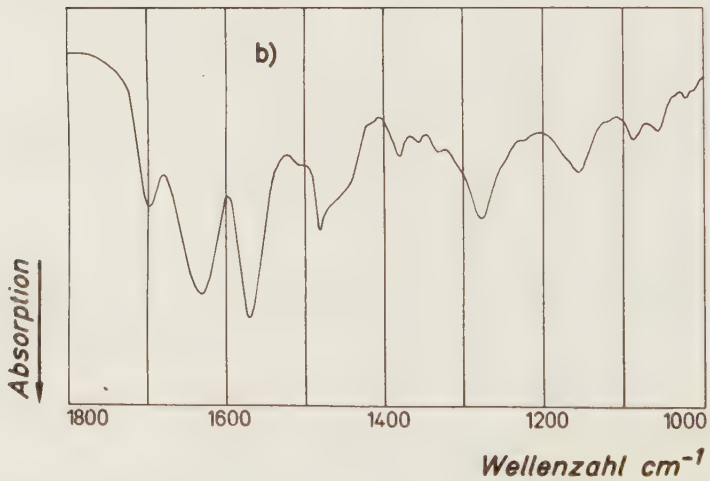
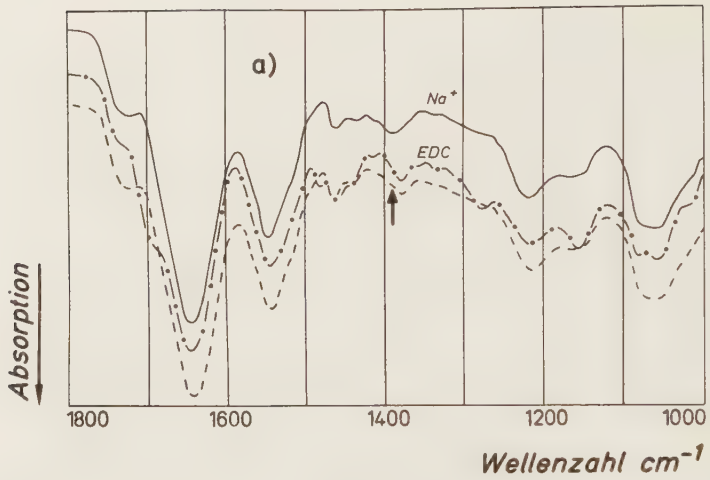


Abb. 27: IR-Spektren von

- a) Axonmembran, —: Na^+ -Kakodylat Puffer pH 5,0
- : Na^+ -Kakodylat + EDC pH 5,0
- -: Zurückdialyse mit Na^+ -Kako-
- dylat-Puffer pH 5,0

b) 0,8 mM EDC

4.2.1. Vergleich von Axon- und Myelinversikeln

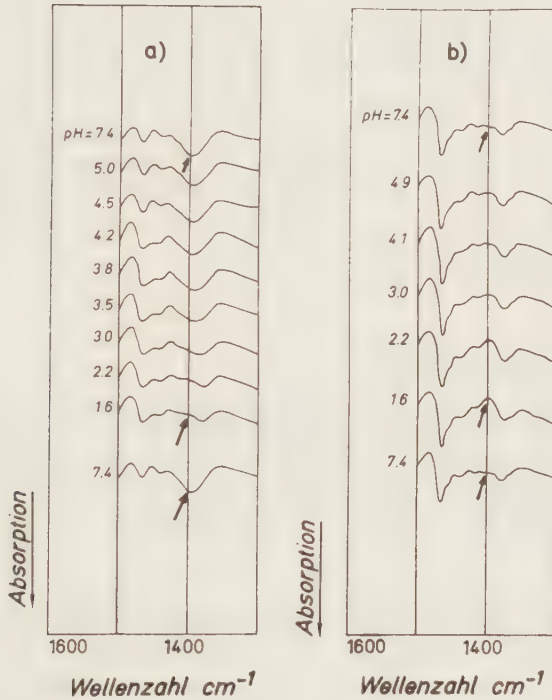


Abb. 28: IR-Spektren von

- a) Axonmembran in Na^+ -kakodylhaltiger Lösung
 - b) Myelinmembran in Na^+ -kakodylhaltiger Lösung
- in Abhängigkeit vom pH-Wert

In Abb. 28 wird die pH-Abhängigkeit der Carboxylschwingung von Axonmembran- und Myelinmembranvesikeln verglichen. Im Gegensatz zum Spektrum der Axonmembranvesikeln ist die Bande der symmetrischen Valenzschwingung der Carboxylgruppen bei Myelin sehr schwach. Sie ist bei Myelin nur durch die Abnahme ihrer Intensität mit abnehmendem pH-Wert bei 1400 cm^{-1} zu erkennen. Dies bedeutet, daß die Konzentration der Carboxylgruppen in Myelin sehr viel geringer ist als die in Axonmembranvesikeln. Eine quantitative Abschätzung zeigt, daß die Konzentration der Carboxylgruppen in den Myelinvesikeln weniger als 25% derjenigen in Axonmembranvesikeln beträgt.

4.2.2 pKa der -COO^- Gruppen

Da die -COO^- Gruppen in den Axonmembranvesikeln eine bedeutende Rolle spielen (siehe dazu Kapitel 3.4. und 3.5.), habe ich den pKa-Wert dieser -COO^- Gruppen anhand der Intensitätsänderung der $\nu_{\text{s-COO}^-}$ Bande berechnet.

Wie man in Abb. 28 sieht, wird die Intensität der $\nu_{\text{s-COO}^-}$ Bande durch zunehmende Protonierung immer schwächer. Diese Bande ist bei $\text{pH} = 2,2$ verschwunden. Andererseits kann man beobachten, daß die -COOH Bande bei 1380 cm^{-1} immer deutlicher wird. Anhand dieser Intensitätsänderung der $\nu_{\text{s-COO}^-}$ Bande habe ich die Titrationskurven (Abb. 29) gemessen und daraus die pKa-Werte für die -COO^- Gruppen bestimmt. Bei den Axonmembranvesikeln ergibt sich ein pKa-Wert von 3,5, bei Myelin von 4,3. Im Fall der Pellet-Fraktion schließlich fand ich für die -COO^- Gruppe einen pKa-Wert von 3,9.

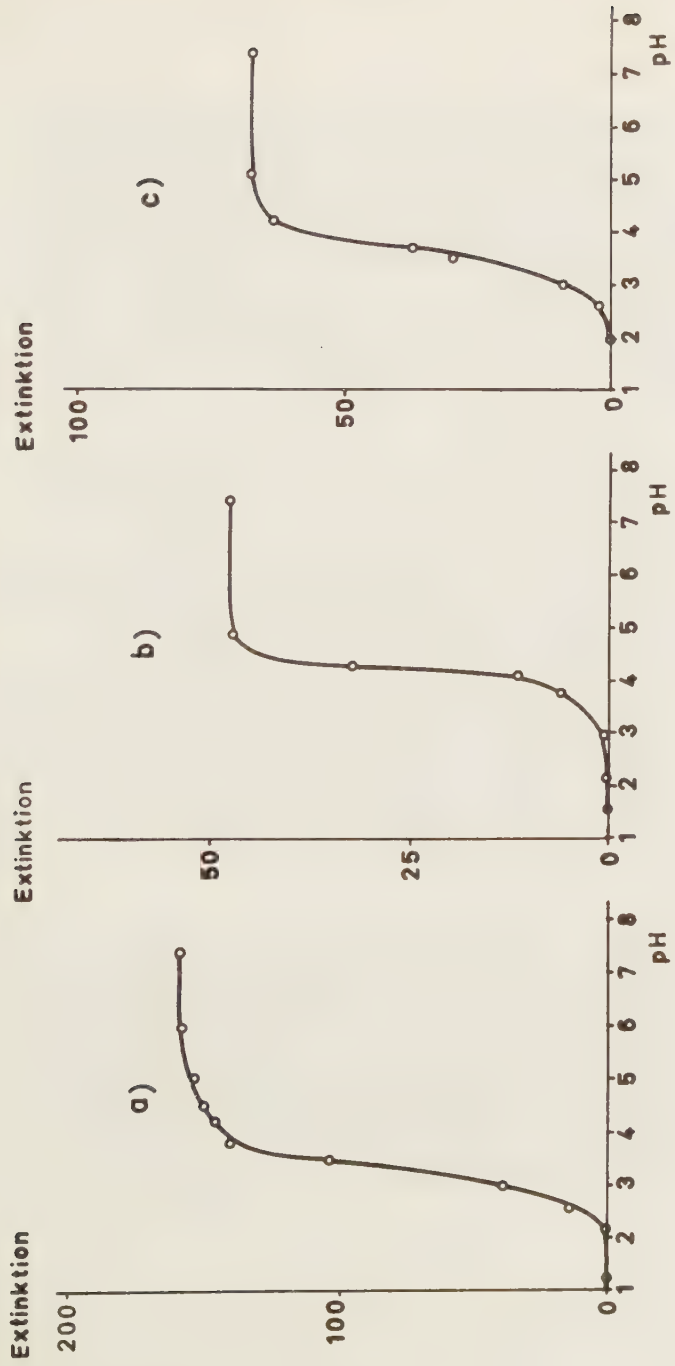


Abb. 29: Titrationskurve für die Bestimmung des pKa-Wertes
a) Axonmembran b) Myelinmembran c) Pellet-Fraktion

Der Vergleich der pKa-Werte von Axonmembranvesikeln und Myelin zeigt folgendes: Bei den Axonmembranvesikeln ist der pKa-Wert der Carboxylgruppen kleiner als bei den Myelinvesikeln. Der pKa-Wert von Carboxylgruppen wird umso kleiner, je polarer das Medium ist, in dem sie sich befinden (63). Wie zu erwarten ist, zeigt sich, daß sich die Carboxylgruppen in den Axonmembranvesikeln in einer mehr polaren Umgebung befinden als in den Myelinmembranvesikeln.

4.2.3. Flächendichte der -COO^- Gruppe in der Axonmembran

Aus den in Abb. 28 a gezeigten Spektren kann die Flächendichte der Carboxylgruppen bestimmt werden. Um dies durchzuführen, habe ich die Spektren von CH_3COONa in unterschiedlichen Konzentrationen aufgenommen (Abb. 30) und die Intensität der $\nu_{\text{s}}\text{-COO}^-$ Bande mit der der Axonmembranfraktion verglichen. Die Intensität der $\nu_{\text{s}}\text{-COO}^-$ Bande von 100 mM CH_3COONa entspricht der der Axonmembranfraktion. Die Genauigkeit beträgt dabei 3%. Damit ist die Konzentration der -COO^- Gruppen der Axonmembranfraktion 100 m molar mit einer Genauigkeit von 3%.

In einem ml von 100 mM CH_3COONa Lösung befinden sich 6×10^{19} -COO^- Gruppen. Für eine Küvettenfüllung werden acht Olfactorii des Hechtes mit einer Gesamtlänge von 26,4 cm (die Genauigkeit beträgt 1 - 5%) benötigt, aus denen $100 \text{ mm}^3 \pm 10\%$ Vesikeln für eine Küvettenfüllung notwendig war. Hierin wiederum befinden sich etwa $6 \times 10^{18} \pm 13,3\%$ -COO^- Gruppen.

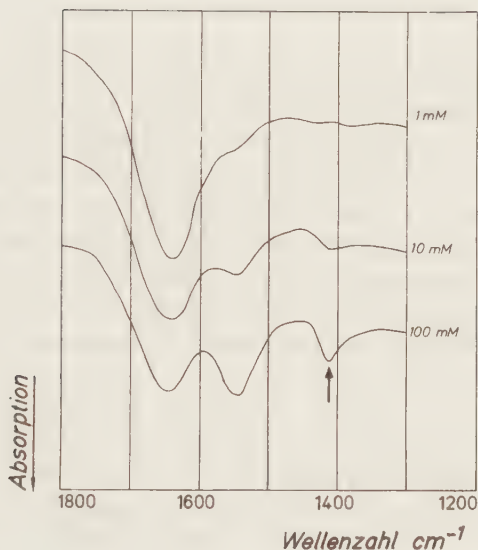


Abb. 30 : IR-Spektren von CH_3COONa mit unterschiedlichen Konzentrationen, gelöst in H_2O

Wie ich in Kapitel 2.2.1. beschrieben habe, besteht ein Olfactorius aus $4,2 \times 10^6$ Einzelfasern. 95% davon haben einen durchschnittlichen Durchmesser von $0,19 \mu\text{m}$ und die restlichen 5% $0,6 \mu\text{m}$. Aus diesen experimentellen Daten kann man die Gesamtfläche der Axonmembranen aus acht Olfactorii berechnen. Diese ergibt sich dann zu $7,1 \times 10^3 \text{ cm}^2$. In dieser Membranfläche befinden sich 6×10^{18} $-\text{COO}^-$ Gruppen. Damit befinden sich in einem cm^2 der Axonmembran $8,4 \times 10^{14} \pm 15\%$ $-\text{COO}^-$ Gruppen.

4.2.3.1 -COO⁻ Gruppen und Ionenkanal

Wie wir bereits gesehen haben, beträgt die Flächendichte der Carboxylgruppen $8,4 \times 10^{14} \pm 15\% \text{ -COO}^-/\text{cm}^2$. Von Untersuchungen an verschiedenen erregbaren Membranen ist bekannt, daß die Dichte der Oberflächenladung, die den Carboxylgruppen zugeschrieben wird (46), im Bereich von einer Ladung pro $100 - 300 \text{ \AA}^2$ liegt (47). Bei einem Durchschnitt von einer Ladung pro $200 \text{ \AA}^2$ entfallen auf einen cm^2 5×10^{13} Ladungen. Nach Chandler (64) gibt es nicht nur an der äußeren Membranoberfläche, sondern auch an der inneren Fläche negative Oberflächenladungen. Jedoch wurde von Mc Laughlin und Harary gezeigt (65), daß die Oberflächenladung an der äußeren Membranoberfläche größer ist, als an der inneren. Damit zeigt der Vergleich der Oberflächenladungsdichte mit der von mir bestimmten Flächendichte der Carboxylgruppen, daß sich mehr als acht mal soviel Carboxylgruppen im Inneren der Membran befinden als an der Oberfläche. Es ist somit anzunehmen, daß die relativ große Anzahl hydrophiler Carboxylgruppen in der erregbaren Membran für die Leitungseigenschaften der Ionenkanäle von großer Bedeutung sind.

5. Zusammenfassung

Es wurde die kationenabhängige Konformationsänderung sowie der pKa-Wert und die Konzentration der -COO^- Gruppen an der erregbaren Membran bzw. am Myelin IR-Spektroskopisch untersucht. Dabei wurde die FMIR-Technik verwendet. Weiterhin wurde die Flächendichte der -COO^- Gruppen in erregbaren Membranen berechnet. Bei diesen Untersuchungen wurde als erregbare Membran die Axonmembran aus dem Olfactorius des Hechtes isoliert, da dieses Axon nicht-myelinisiert ist. Als Myelin wurde das des Zerebralcortex des Schweins verwendet.

Die bis jetzt von manchen Autoren behauptete Na^+ - bzw. K^+ -Abhängigkeit der Konformationsumwandlung an der erregbaren Membran konnte nicht beobachtet werden. Dabei hat die Anwesenheit von zweiwertigen Kationen, die von Natur aus in der Membran vorhanden sind, keinerlei Einfluß. Jedoch war die reversible Konformationsumwandlung im pH-Bereich von $<4,5$ an den Axonmembranvesikeln zu beobachten. Dabei zeigt die Konformation der Membranproteine eine Umwandlung zur β -Struktur, während ansonsten diese weitgehend helikal ist. Im Gegensatz zu den Axonmembranvesikeln zeigt sich, daß das Membranprotein des Myelins bereits im physiologischen pH-Bereich einen gewissen Anteil von β -Struktur hat. Diese β -Struktur wird weder von K^+ - oder Na^+ -Ionen noch von den von Natur aus in der Membran vorhandenen zweiwertigen Kationen beeinflusst. Ferner ist diese Struktur des Membranproteins des Myelins so stabil, daß es im extrem niedrigen pH-Bereich ebenfalls unverändert bleibt.

Es wird vielfach vermutet, daß die Proteine erregbarer Membranen beim Durchlauf des Aktionspotentials verschiedene Konformationen annehmen. Dabei wird angenommen, daß die Konformationsumwandlung des Membranproteins bei Phosphorylierung und Dephosphorylierung stattfinden soll. Dies wurde in meiner Arbeit unter der Zugabe von ATP in Anwesenheit von Na^+ -, K^+ - und Mg^{2+} -Ionen untersucht. Die Konformationsumwandlung war jedoch nicht festzustellen. Die Konformation der Membranproteine ist weitgehend helikal.

Die erhaltenen pKa-Werte von 3,5 der -COO^- Gruppen in den Axonmembranvesikeln bzw. von 4,3 in den Myelinvesikeln zeigen, daß sich die -COO^- Gruppen in der Axonmembran in einer mehr polaren Umgebung befinden als in den Myelinvesikeln. Der Vergleich der Flächendichte der -COO^- Gruppen in der Axonmembran aus dem Olfactorius des Hechtes mit der durchschnittlichen Oberflächendichte von verschiedenen erregbaren Membranen zeigt, daß -COO^- Gruppen nicht nur an der Membranoberfläche, sondern auch in der Membran vorhanden sind. Die Konzentration der -COO^- Gruppen in der Membran ist achtmal höher als an ihrer Oberfläche. Damit ist es sehr wahrscheinlich, daß -COO^- Gruppen in der erregbaren Membran für die Leitungseigenschaften der Ionenkanäle von großer Bedeutung sind.

Literatur

- (1) J. F. Danielli und H. Davson: J. Cell. Comp. Physiol. 5, 495 (1935)
- (2) D. E. Green und A. Tzagoloff: J. Lipid Res. 7, 587 (1966)
- (3) F. S. Sjöstrand: J. Ultrastruc. Res. 9 340 (1963)
- (4a) A. Benson: J. Amer. Oil. Chem. Soc. 43, 265 (1966)
- (4b) R. Rendi und A. E. Vatter: Protoplasma 63, 202 (1967)
- (4c) D. F. H. Wallach und A. Grodon: Fed. Proc. 27, 1263 (1968)
- (5) N. J. Harrick: "Internal Reflection Spektros-copy", Interscience Publishers, New York (1967)
- (6) P. Krohmer und R. Duelli: "Perkin Elmer Tips 35 UR", Überlingen (1967)
- (7) A. von Muralt, E. R. Weibel und J. V. Howarth: Pflüg. Arch. 367, 67 (1976)
- (8) C. Hegyvary und R. L. Post: J. Biol. Chem. vol. 246, 5234 (1971)
- (9) C. H. Fiske and Y. Subbarow: Biol. Chem. 66, 375 (1925)
- (10) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall: J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- (11) E. Cotman, C. B. Mahler und A. G. Anderson: BBA, 163, 272 (1968)
- (12) P. Schrager und E. Profera: BBA 318, 141 (1973)
- (13) A. L. Hodgkin: "The Conduction of the Nervous Impulse", Liverpool University Press, Liverpool (1967)

- (14a) J. Bernstein: Pflüg. Arch. ges. Physiol. 92, 521 (1902)
- (14b) J. Bernstein: "Elektrobiologie", Braunschweig (1912)
- (15) E. D. Adrian: J. Physiol. 133, 631 (1956)
- (16) A. L. Hodgkin und B. Katz: J. Physiol. (London) 108, 37 (1949)
- (17) A. von Muralt: "Neue Ergebnisse der Nervenphysiologie", Springer Verlag, Berlin (1958)
- (18) A. v. Hill: Proc. Roy. Soc., Ser. B. 126, 136 (1938)
- (19) I. Tasaki: "Nerv Excitation", Charles C. Thomas, Springfield (1968)
- (20) A. L. Hodgkin: Proc. Roy. Soc., Ser. B, 148, 1 (1958)
- (21) A. L. Hodgkin und A. F. Huxley: J. Physiol. (Lond.) 117, 400 (1952)
- (22) A. L. Hodgkin und A. F. Huxley: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 17, 43 (1952)
- (23) A. L. Hodgkin und R. D. Keynes: J. Physiol. (Lond.) 128, 28 (1955)
- (24) P. C. Caldwell, A. L. Hodgkin, R. D. Keynes und T. I. Shaw: J. Physiol. (Lond.) 152, 561 (1960)
- (25) I. C. Skou: Bioenergetics 4, 14 (1972)
- (26a) I. M. Glynn: J. Physiol. (Lond.) 160, 18 (1962)
- (26b) R. Whittam: Biochem. J. 84, 110 (1962)
- (27) J. C. Skou: Tops. Bioenergetics 4, 357 (1971)
- (28a) P. F. Baker: J. Physiol. (Lond.) 180, 383 (1965)
- (28 b) P. F. Baker: J. Physiol. (Lond.) 185, 270 (1966)

- (29) J. C. Skou: "Progr. Biophys. Mol Biol." 14, 133 (1964)
- (30) W. Schoner: Angew. Chem. 83, 947 (1971)
- (31) R. L. Post, S. Kume und F. N. Rogers: Mechanismus in Bioenergetics, Akademie Press, 203 (1973)
- (32a) B. Hille: Prog. Biophys. Mol. Biol. 71, 1 (1970)
- (32b) C. M. Armstrong: J. G. Physiol. 58, 413 (1971)
- (33) T. Narahashi: Physiol. Rev. 54, 889 (1974)
- (34a) B. Hille: Prog. Biophysic. Mol. Biol. 21, 1 (1970)
- (34b) C. M. Armstrong, F. Bezanilla und E. Rojas: J. Gen. Physiol. 62, 91 (1973)
- (35a) B. Hille: J. Gen. Physiol. 51, 199 (1968)
- (35b) R. D. Keynes, J. M. Ritchie und E. Rojas: J. Physiol. 213, (1971)
- (35c) D. Colquhoun und J. M. Ritchie: J. Physiol. 221, 533 (1972)
- (35d) T. E. Benzer: Proc. Nat. Acad. Scie. U. S. A. 69, 3634 (1972)
- (35e) W. Ulbricht: Biophys. Struct. Mechan. 1, 1 (1974)
- (35f) J. M. Ritchie: Philo. Trans. Roy. Soc. Lond. 270, 319 (1975)
- (36) M. H. Evans: Lut. Rev. Neurobiol. 15, 83 (1972)
- (37) J. M. Fox: Pflügers Arch. 351, 287 (1974)
- (38a) G. R. Strichartz: J. G. Physiol. 62, 37 (1973)
- (38b) D. T. Frazier, T. Narahashi und M. Yamada: J. Pharmacol. Exp. Ther. 45, 171 (1970)
- (38c) T. Narahashi, N. C. Anderson und J. W. Moor: Science (Wash. P. C.) 153, 765 (1966)
- (39a) B. Hille: J. Gen. Physiol. 58, 599 (1971)
- (39b) A. M. Woodhull: J. Gen. Physiol. 61, 687 (1973)

- (40a) I. Tasaki und S. Hagiwara: J. Gen. Physiol. 40
851 (1957)
- (40b) C. M. Armstrong: Quarterly Rev. Biophys. 7,
2, 179 (1975)
- (40c) Mozahayeva, G. N. und A. P. Naumov: EBA 29o,
248 (1972)
- (41) P. Schragar: J. Gen. Physiol. 64, 660 (1974)
- (42) B. Hille, A. M. Woodhull und B. I. Shapiro:
Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Scie.
27o, 301 (1975)
- (43) S. Segal and B. Neumke: J. Biophysic. 8,
470 (1968)
- (44) S. P. Verma, D. F. H. Wallach und I. C. P. Smith:
BBA 354, 129 (1974)
- (45a) S. Mac Laughlin: J. Memb. Biol. 9, 361, 1972
- (45b) W. S. Chelack. A. Petkau und T. P. Loppers:
BBA 274, 28 (1971)
- (46) H. Drouin und B. Neumke: Pflügers Arch. 351
207 (1974)
- (47) N. Lakshminarayanaiah: J. Memb. Biol. 29,
243 (1978)
- (48a) B. Neumke: J. Elektrochem. Soc. 123, Nr. 9
1331 (1978)
- (48b) H. Drouin Bioelektrochem. and Bioenerg. 3,
222 (1976)
- (49) I. Tasaki, A. Watanabe, R. Sandling und
C. Carnay: Proc. Natl. Acad. Scie. U. S.
61, 883 (1968)
- (50) F. Conti and I. Tasaki: Science 196,
1322 (1970)
- (51) J. C. Hsia, P. T. S. Wong and D. H. MacLeman:
Bioch. Biophys. Res. Commun. 43, 88 (1971)

- (52) G. Papakostidis, G. Zundel und E. Mehl: BBA 288, 277 (1972)
- (53) L. B. Cohen, R. D. Keynes and B. Hille: Nature 218, 438 (1968)
- (54a) D. F. H. Wallach and P. H. Zahler: Proc. Natl. Acad. Sci. 56, 1592 (1966)
- (54b) D. F. H. Wallach and P. H. Zahler: BBA 150, 186 (1968)
- (55) J. M. Graham and D. F. H. Wallach: BBA 241, 180 (1971)
- (56a) A. von Muralt: Abst. 25th Inst. Physiol. Congr. Mün., 638 (1971)
- (56b) A. von Muralt, E. R. Weibel and I. V. Howarth: Pflügers Arch. 367, 67 (1976)
- (56c) A. von Muralt: HNO 25, 2 (1977)
- (57) J. V. Howarth, R. Keynes, M. Ritchie und A. von Muralt: J. Physiol. Lond. 294, 349 (1975)
- (58) F. S. Parker: "Application of Infrared Spektros-copy in Biochemistry, Biology and Medicine" A. Hilger, London (1971)
- (59a) L. C. Thomas und R. A. Chittenden: Spektrochem. Acta 20, 489 (1964)
- (59b) L. C. Thomas und R. A. Chittenden: Spektrochem. Acta 20, 467 (1964)
- (60) E. D. Korn: Ann. Rev. Biochem. 38, 263 (1969)
- (61) D. M. Easton: Science 172, 952 (1971)
- (62) D. Hadži und N. Sheppard: Proc. Roy. Soc. 216, 247 (1953)
- (63a) R. Lindemann und G. Zundel: J. Chem. Soc. Faraday Trans. II 73, 788 (1977)
- (63b) R. Lindemann und G. Zundel: Biopolymers 17, 5 1285 (1978)

- (64) W. K. Chandler, A. L. Hodgkin and H. Meves:
J. Physiol. (London) 180. 821 (1965)
- (65) S. Mc Laughlin and H. Harary: Biophys. J. 14,
200 (1974)

Lebenslauf

Name: Sakiko Hornik, geb. Ito

Geburtsdatum: 27. 3. 1945

Geburtsort: Tsu/Japan

Staatsangehörigkeit: japanisch

Familienstand: verheiratet, ein Kind

Eltern: Dipl. Phys. Masahiko Ito
und Frau Fujiko, geb. Aoki

Schulbildung: 1951 - 57 Volksschule Tsu/Japan
1957 - 63 Gymnasium Tsu/Japan
1963 Aufnahmeprüfung an der
Universität Nara/Japan

Hochschule: 1963 - 67 Studium der Physik an der
Universität Nara/Japan
1967 Diplomprüfung in Physik
(Anerkennung durch Urkunde
des B. St. Min. f. U. u. K.
vom 14. 9. 1973)
1976 - 77 Studium der Chemie an der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

Berufsweg: 1967 - 69 Wiss. Assistentin an der Med.
Fakultät der Universität
Nagoya/Japan
1973 - 74 Techn. Assistentin am Bota-
nischen Institut der TU München
1974 - 78 Anfertigung der Dissertation
am Physikalisch-Chemischen
Institut der Universität
München bei Prof. Dr. G. Zundel

